



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

DETERMINAÇÃO DE SENSIBILIDADE AUDITIVA ATRAVÉS DE POTENCIAIS
EVOCADOS AUDITIVOS EM TRÊS ESPÉCIES DE AVES DE RAPINA

CLARISSE REIS PILOTO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Maria de São José Sousa

Deyrieux Centeno

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de
Carvalho

CO-ORIENTADOR

Doutor Rafael Cediél Algovia

2019
LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

DETERMINAÇÃO DE SENSIBILIDADE AUDITIVA ATRAVÉS DE POTENCIAIS
EVOCADOS AUDITIVOS EM TRÊS ESPÉCIES DE AVES DE RAPINA

CLARISSE REIS PILOTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Almeida Ferreira

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Maria de São José Sousa
Deyrieux Centeno

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de
Carvalho

CO-ORIENTADOR

Doutor Rafael Cediél Algovia

2019
LISBOA

Agradeço ao meu Orientador, Professor Luís Madeira de Carvalho, pelo apoio, paciência, simpatia e por me ter ajudado a conseguir o estágio no GREFA.

Agradeço ao meu Co-orientador, Rafael Cediel Algovia, pelo equipamento disponibilizado para o estudo e conhecimento passado, sem ele o tema da minha dissertação teria sido muito diferente.

À minha companheira investigadora e amiga Nerea, que me acompanhou na realização e interpretação dos testes e foi um apoio e uma ajuda sempre que precisei.

Aos meus companheiros de casa e de vida, o meu namorado Gonçalo e a minha amiga Mariana, que estiveram nesta luta comigo, com quem partilhei as frustrações e felicidades de fazer este trabalho.

À minha família por estar sempre lá, os meus pais que sempre garantiram que nunca me faltasse nada, à minha avó por ser a minha consciência e especialmente à minha irmã Leonor, que tantas vezes me acompanhou no trabalho.

E aos restantes amigos que me foram dando momentos de alegria e descontração assim como palavras de apoio e força para continuar: Cristiana, Rita, Liliana, João, Mariana, Sara, Maria, Filipa, Inês, Bia, entre outros, obrigada, tenho muita sorte por ter tantas pessoas por quem me sentir grata.

Determinação de sensibilidade auditiva através de potenciais evocados auditivos em três espécies de aves de rapina.

Resumo

Os estudos eletrofisiológicos de audição em aves, mais especificamente a detecção de respostas auditivas do tronco cerebral, são muito direcionados para aves canoras e rapinas noturnas. Existem ainda muitas outras espécies cuja sensibilidade auditiva é desconhecida e cujo conhecimento poderá ter aplicações importantes não só em clínica e investigação, mas também na conservação de espécies. Além disso a técnica encontra-se ainda pouco desenvolvida para aves de rapina, existindo espaço para otimização do protocolo. Assim estudou-se a sensibilidade auditiva de três rapinas diurnas autóctones da Península Ibérica, nomeadamente Grifo (*Gyps fulvus*), Águia real (*Aquila chrysaetos*) e Peneireiro-vulgar (*Falco tinnunculus*), tentando adaptar o teste a estas espécies, desde os transdutores usados, à anestesia até ao esquema de elétrodos utilizado. Os testes foram realizados com sucesso, demonstrando mais ondas replicáveis que na maior parte de outros estudos em aves, o que poderá significar que as alterações feitas no protocolo poderão aumentar a sensibilidade para a detecção de ondas. Apesar disto detetou-se uma tendência para maior sensibilidade a frequências mais altas do que seria de esperar, principalmente em *Aquila chrysaetos* e *Falco tinnunculus*, que poderá ser justificada por variação individual ou erro experimental.

Além da potencial utilização dos resultados apresentados, esta dissertação de mestrado é também uma monografia acerca desta técnica com o objetivo de permitir o seu melhor entendimento e aplicação em Ciências Veterinárias.

Palavras-chave: Potenciais evocados; Aves de rapina; Sensibilidade auditiva; Resposta Auditiva do Tronco Cerebral; Audiograma.

Hearing sensitivity determination through auditory evoked potentials in three species of birds of prey.

Abstract

Electrophysiological studies of hearing in birds, more specifically the detection of auditory brainstem responses, are very focused on songbirds and nocturnal birds of prey. There are still many other species whose hearing sensitivity is unknown and whose knowledge may have important applications not only in clinical practice and research, but also in species conservation. In addition, the technique is still poorly developed for birds of prey, and there is room for protocol optimization. Thus, the auditory sensitivity of three native diurnal birds of prey of the Iberian Peninsula, namely Griffon Vulture (*Gyps fulvus*), Golden Eagle (*Aquila chrysaetos*) and Common Kestrel (*Falco tinnunculus*), was tested and the protocol was adapted to these species, from the transducers used, to the anesthesia, to the electrode scheme used. The tests were successfully performed, demonstrating more replicable waves than in most other avian studies, which could mean that changes made in the protocol could increase the sensitivity for wave detection. Despite this, there was a tendency for higher sensitivity to higher frequencies than would be expected, especially in *Aquila chrysaetos* and *Falco tinnunculus*, which may be justified by individual variation or experimental error.

In addition to the potential use of the presented results, this Master's dissertation is also a monograph about this technique, with the aim of allowing its better understanding and application in Veterinary Sciences.

Keywords: Evoked potentials; Birds of prey; Hearing sensitivity; Auditory Response of the Cerebral Trunk; Audiogram.

Determinación de la sensibilidad auditiva a través de potenciales evocados auditivos en tres especies de aves de presa.

Resumen

Los estudios electrofisiológicos de audición en aves, más específicamente la detección de respuestas auditivas del tronco cerebral, están muy dirigidos a aves canoras y rapaces nocturnas. Existen muchas otras especies cuya sensibilidad auditiva es desconocida y cuyo conocimiento puede tener aplicaciones importantes no sólo en clínica y investigación, pero también en la conservación de especies. Además, la técnica se encuentra todavía poco desarrollada para rapaces, existiendo espacio para optimización del protocolo. Se estudió la sensibilidad auditiva de tres rapaces diurnas autóctonas de la Península Ibérica, en particular Buitre Común (*Gyps fulvus*), Águila Real (*Aquila chrysaetos*) y Cernícalo Vulgar (*Falco tinnunculus*), intentando adaptar el test a estas especies, desde los transductores usados, a la anestesia, hasta el esquema de electrodos utilizado. Las pruebas se realizaron con éxito, demostrando más ondas replicables que en la mayoría de otros estudios en aves, lo que podría significar que los cambios en el protocolo podrían aumentar la sensibilidad para la detección de ondas. A pesar de esto se detectó una tendencia hacia una mayor sensibilidad a frecuencias más altas de lo que cabría esperar, principalmente en *Aquila chrysaetos* y *Falco tinnunculus*, que podría justificarse por variación individual o error experimental.

Además del uso potencial de los resultados presentados, la presente disertación de maestría es también una monografía sobre esta técnica con el objetivo de permitir su mejor comprensión y aplicación en Ciencias Veterinarias.

Palabras clave: Potenciales evocados; Aves de presa; Sensibilidad auditiva; Respuesta auditiva del tronco cerebral; Audiograma.

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Resumén.....	v
Índice.....	vi
Lista de Gráficos.....	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Esquemas.....	x
Lista de Equações.....	x
Lista de Siglas e Abreviaturas	x
Revisão bibliográfica	1
1. Audição em aves	1
2. Estrutura e função do aparelho auditivo.....	3
2.1. Aparelho auditivo periférico	3
2.2. Sistema nervoso auditivo central.....	17
3. Avaliação Auditiva.....	19
3.1. Respostas Evocadas Auditivas (REA)	19
3.2. Resposta Auditiva do Tronco Cerebral (RATC).....	21
4. Resultados da medição e a sua análise	35
4.1. Gráficos de onda	35
4.2. Origem anatómica das ondas	36
4.3. Avaliar presença de resposta.....	37
4.4. Latência e amplitude dos componentes da resposta em aves	38
4.5. Latências inter-picos.....	39
4.6. Determinação de limiares.....	39
4.7. Audiograma.....	40
4.8. Alterações mais frequentes e o seu significado.....	42
5. Aplicações da técnica em aves.....	44
5.1. Em investigação	44
5.2. Em clínica veterinária	44
5.3. Em medicina de conservação.....	45
Objetivos	46
Materiais e Métodos.....	46

6. Animais utilizados	46
7. Equipamento de audiometria.....	47
8. Protocolo e restantes materiais.....	47
8.1. Preparação do teste	47
8.2. Preparação do animal.....	48
8.3. Estímulos utilizados e processamento	50
9. Análise de dados	50
Resultados	52
10. Gráficos de onda	52
10.1. <i>Gyps fulvus</i>	52
10.2. <i>Falco tinnunculus</i>	52
10.3. <i>Aquila chrysaetos</i>	52
10.4. Comparações entre aves	53
11. Latências e Amplitudes das ondas	54
11.1. <i>Gyps fulvus</i>	54
11.2. <i>Falco tinnunculus</i>	55
11.3. <i>Aquila chrysaetos</i>	56
11.4. Comparações entre aves	57
12. Limiares auditivos e audiogramas.....	61
Discussão.....	63
13. Gráficos de onda	63
14. Latências e amplitudes das ondas.....	65
15. Limiares auditivos e audiogramas.....	67
Conclusão	70
16. Perspetivas futuras.....	71
17. Limitações do estudo	71
Referências.....	72
Anexos.....	77

Gráfico 1 – Representação da média de audiogramas de três grupos de aves (Adaptado de R. Dooling, 2002).....	2
Gráfico 2 – Representação dos diferentes tipos de respostas evocadas auditivas em humanos (Adaptado de Hall, 2015).....	20
Gráfico 3 – Gráfico de RATC da Águia-real utilizada no presente estudo (Original)....	36
Gráfico 4 –Audiograma de RATC de coruja <i>Megascops Asio</i> (Adaptado de Brittan-Powell et al., 2005).....	41
Gráfico 5 – Resposta interpretada de <i>Gyps fulvus</i> , a um estímulo de 2000 Hz a 90 dB SPL de intensidade.	53
Gráfico 6 – Resposta interpretada de <i>Falco tinnunculus</i> , a um estímulo de 4000 Hz a 90 dB SPL de intensidade.....	53
Gráfico 7 – Resposta interpretada de <i>Aquila chrysaetos</i> , a um estímulo de 2000 Hz a 90 dB SPL de intensidade.....	53
Gráfico 8 – Relação entre a latência e intensidade das ondas de resposta de <i>Gyps fulvus</i> ao clique.	54
Gráfico 9 – Relação entre a amplitude e intensidade das ondas de resposta ao clique no exemplar de <i>Gyps fulvus</i>	55
Gráfico 10 – Relação entre a latência e intensidade das ondas de resposta de <i>Falco tinnunculus</i> ao clique.	55
Gráfico 11 – Relação entre a amplitude e intensidade das ondas de resposta de <i>Falco tinnunculus</i> ao clique.	56
Gráfico 12 – Relação entre latência e intensidade da resposta de <i>Aquila chrysaetos</i> a um estímulo clique.....	56
Gráfico 13 – Relação entre amplitude e intensidade da resposta de <i>Aquila chrysaetos</i> a um estímulo clique.....	57
Gráfico 14 – Amplitudes da onda I, em resposta ao estímulo clique a diferentes intensidades, nos três animais.....	58
Gráfico 15 – Latências da onda I, em resposta ao estímulo clique a diferentes intensidades, nos três animais.....	58
Gráfico 16 – Amplitudes da onda I em resposta a um estímulo com intensidade de 90 dB SPL a diferentes frequências, nas três aves.	59
Gráfico 17 – Latências da onda I em resposta a um estímulo com intensidade de 90 dB SPL a diferentes frequências, nas três aves.....	59
Gráfico 18 – Variação das latências inter-pico I-III, com variação da intensidade de um estímulo clique.....	60
Gráfico 19 – Variação das latências de I-V, com variação da intensidade de um estímulo clique.	60

Gráfico 20 – Comparação dos audiogramas dos três animais testados.	62
---	----

Lista de Figuras

Figura 1 – a) Ilustração esquemática do ouvido médio e ducto coclear típico de uma ave (Adaptado de Necker, 2000). b) Representação da relação entre a columela e a membrana timpânica de outra perspetiva (Adaptado de Meyer, 1986).	7
Figura 2 – a) Representação esquemática do ouvido médio e seu funcionamento numa ave. b) Mecanismo de alavanca de segunda classe (Adaptado de Köppl, 2015).	8
Figura 3 – Ilustração do labirinto membranoso de uma ave distinguindo-se o aparelho vestibular (a) e o coclear (b) (Adaptado de Meyer, 1986).	10
Figura 4 – Representação tridimensional de corte transversal do ducto coclear na região mais apical (região de maior sensibilidade a baixas frequências da papila basilar) (Adaptado de Necker, 2000).	13
Figura 5 – Imagem da papila basilar com representação esquemática das células ciliadas e a sua inervação (Adaptado de Köppl, 2015).	14
Figura 6 – Representação esquemática da organização das ligações-topo dos estereocílios de células ativadas (a) e em descanso (b) (adaptado de Necker, 2000).	16
Figura 7 – Fluxo de iões na fase de excitação de uma célula ciliada (adaptado de Necker, 2000).	16
Figura 8 – Diagrama do caminho nervoso auditivo ascendente com a localização dos principais núcleos nervosos auditivos (Adaptado de Necker, 2000).	18
Figura 9 – Esquemas do posicionamento de elétrodo para registo de RATC (Original).	30
Figura 10 – Ilustrações científicas representativas de cada espécie testada (Adaptado de Assírio & Alvim, 2012).	47
Figura 11 – Fotografias a representar o esquema de elétrodo utilizado e os auriculares adaptados a cada ave (Original).	49
Figura 12 – Traçados resposta de <i>Gyps fulvus</i> (Original).	78
Figura 13 – Traçados resposta de <i>Falco tinnunculus</i> (Original).	79
Figura 14 – Traçados resposta do exemplar de <i>Aquila chrysaetos</i> (Original).	80
Figura 15 – Comparação de gráficos de RATC obtidos neste trabalho com os obtidos em outros estudos.	82

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Anomalias de RATC e os significados prováveis (Adaptada de Linical & Rimer, 2007).	43
Tabela 2 – Alguns dos dados recolhidos para cada ave (original).....	46
Tabela 3 – Dados recolhidos para cada animal	77
Tabela 4 – Valores de limiares de intensidade a cada frequência testada para cada animal.	77

Lista de Esquemas

Esquema 1 – Esquema ilustrativo de um sistema de deteção de respostas evocadas auditivas (Original).....	23
--	----

Lista de Equações

Equação 1 – Rácio de sinal para ruído de fundo.....	34
---	----

Lista de Siglas e Abreviaturas

µV – Microvolt

dB – Decibéis

dB NHL – Decibels Normal Hearing Level

dB SPL – Decibels Sound Pressure Level

ECocG – Eletrococleografia

EEG – Eletroencefalograma

GREFA – Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat

g – grama

Hz – Hertz

ICc – Núcleo Central do Núcleo Mesencefálico pars Dorsal

ICx – Núcleo Externo do Núcleo Mesencefálico pars Dorsal

IHS – Intelligent Hearing Systems

kHz – Kilo Hertz

LL – Núcleo Leminísco Lateral

MLD – Núcleo Mesencefálico pars Dorsal

ms – Milissegundos

mV – Milivolts

NA – Núcleo Angular

NL – Núcleo Laminar

NM – Núcleo Magnocelular

nV – Nanovolts

OS – Oliva Superior

Ov – Núcleo Ovoidal

RATC – Resposta Auditiva do Tronco Cerebral

RAML – Resposta Auditiva de Média Latência

RALL – Resposta Auditiva de Longa Latência

REA – Respostas Evocadas Auditivas

RSR – Rácio Sinal Ruído de Fundo

SNC – Sistema Nervoso Central

1. Audição em aves

A audição ou capacidade auditiva representa a detecção de sinais sonoros pelo ouvido, através da captação de energia vibratória propagada no ambiente e estabelecimento da sua magnitude, direção e significado.

A audição disponibiliza um conjunto de informação única que não se providencia por via de outros sentidos (Martin, 2017). Uma boa capacidade auditiva é essencial para fazer o reconhecimento de indivíduos ou espécies e comunicação entre estes, localização e identificação de predadores e presas, seleção de parceiro, defesa territorial, aprendizagem vocal e detecção de situações de potencial ameaça (Dooling, 1982).

Para avaliar percepção auditiva é fundamental a determinação dos limiares auditivos. Estes representam a pressão sonora mínima audível a diferentes frequências do espectro de audição. Esta informação irá definir o audiograma ou curva auditiva que constitui a melhor forma de caracterizar a audição. É um gráfico ilustrativo da sensibilidade auditiva, a ser discutido em pormenor mais à frente, que serve de ponto de partida para comparação de capacidades auditivas (Dooling, 1982; Martin, 2017).

O limite auditivo máximo detetado em aves chega aos 20 kHz apesar de no geral não ultrapassar os 10 kHz. O intervalo de frequências no qual ouvem melhor é entre 1 kHz a 5 kHz, com sensibilidade absoluta (intensidade mais baixa audível de um som puro) a alcançar os 0 a 10 dB SPL na frequência de maior sensibilidade que se encontra normalmente entre os 2 a 3 kHz (Gráfico 1) (R. J. Dooling, Lohr, & Dent, 2000; Necker, 2000; Martin, 2017).

O espectro auditivo da maior parte das aves estudados mostrou-se mais limitado que o espectro da maioria dos mamíferos. Esta restrição auditiva pode estar em parte associada ao ouvido médio das aves. As aves possuem apenas um ossículo para transferir energia acústica para o ouvido interno enquanto os mamíferos possuem três (Kenneth S. Henry & Lucas, 2008).

Apesar do ouvido de um mamífero ser no geral sensível a um espectro de frequências mais abrangente, a performance auditiva em aves não é necessariamente inferior à de grande parte dos mamíferos, dependendo do parâmetro que estamos a avaliar (Coles, 2007). Por exemplo, a análise temporal em aves é melhor que em humanos (Schwartzkopff, 1968). Entre os animais vertebrados, com a exceção dos mamíferos, as aves possuem o sistema auditivo mais desenvolvido (Necker, 2000).

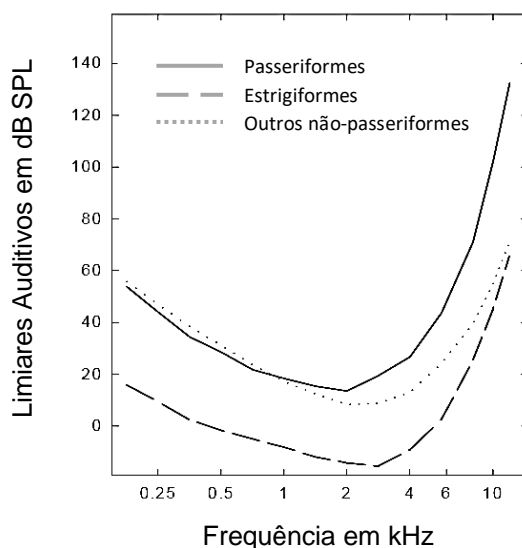
Os limiares auditivos das aves são, regra geral, mais altos que os dos mamíferos provavelmente devido ao facto de a proporção de fibras nervosas ativadas perto do limiar e

o número absoluto de fibras serem menores nesta classe de vertebrados (Brittan-Powell, Dooling, & Gleich, 2002).

O estudo da audição em aves pode providenciar uma perspectiva importante da evolução e adaptação do aparelho auditivo em diferentes ambientes, assim como potencial desenvolvimentos acerca da detecção e discriminação de som (Dooling, 1982).

Apesar de morfologicamente muito semelhantes enquanto classe, as aves passaram por uma extensiva e complexa irradiação adaptativa a uma grande variedade de habitats (Dooling, 1978). Assim surgiram espécies com diferentes capacidades auditivas consoante a sua adaptação ao ambiente em que se encontravam.

Gráfico 1 – Representação da média de audiogramas de três grupos de aves (Adaptado de R. Dooling, 2002).



A média dos Passeriformes foi realizada com audiogramas de 20 exemplares, a dos Estrigiformes com 13 e a de outros não-Passeriformes com 15 espécies diferentes.

No geral as rapinas noturnas ouvem melhor que as aves canoras e não-canoras em todo o seu espectro auditivo (Dooling et al., 2000). Nas noturnas, a audição é provavelmente o sentido mais desenvolvido (Cooper, 2002), sendo a Coruja das Torres (*Tyto Alba*) o animal terrestre com maior capacidade de localização de som (Coles, 2007).

Aves canoras tendem a ouvir melhor a altas frequências que as não-canoras e aparentam ter maior capacidade de resolução temporal que os mamíferos. As não-canoras, nas quais se incluem as espécies estudadas neste trabalho, têm capacidade para ouvir melhor a frequências mais baixas que as canoras. Algumas exceções ao padrão geral de audição em aves são, por exemplo, o Pombo comum (*Columba Livia*) que poderá ter uma sensibilidade auditiva invulgarmente apurada para baixas frequências, podendo ser capaz de processar infrassons. Existem também algumas aves noturnas com capacidade de ecolocalização

como o Guácharo (*Steatornis caripensis*), adaptado a viver em locais cavernosos (Dooling et al., 2000).

Neste trabalho foram utilizadas três rapinas diurnas: um Peneireiro-vulgar (*Falco tinnunculus*), uma Águia-real (*Aquila chrysaetos*) e um Grifo (*Gyps fulvus*), dos quais não existem ainda dados acerca da sensibilidade auditiva.

2. Estrutura e função do aparelho auditivo

A audição depende da estrutura e função do órgão auditivo, o ouvido, e do processamento do estímulo auditivo no sistema nervoso central (SNC). As ondas sonoras entram no ouvido pelo meato acústico externo convergindo até alcançar a membrana timpânica. Os movimentos desta membrana são transmitidos ao ouvido interno através de um ossículo no ouvido médio, a columela aviária. O ouvido interno é parte do labirinto que contém várias porções sensoriais das quais a papila basilar é a principal estrutura a servir funções auditivas. Movimentos gerados pelas ondas sonoras na papila basilar resultam na estimulação mecânica dos recetores sensoriais localizados na papila, as células ciliadas. A excitação destas células é transmitida ao nervo auditivo cujas fibras transportam a informação até ao SNC onde se dá o processamento desta informação. Por fim isto traduz-se em audição e respostas comportamentais (Coles, 2007).

2.1. Aparelho auditivo periférico

O ouvido de uma ave, tal como o de um mamífero, encontra-se dividido em três partes: o ouvido externo, ouvido médio e ouvido interno. De uma perspetiva funcional podemos considerar que este apresenta uma porção condutora e uma porção sensorial. A primeira correspondente ao ouvido externo e médio onde sucede a transmissão, modulação e condução das ondas sonoras até ao ouvido interno que corresponde à porção sensorial onde se processa a energia sonora em energia elétrica para ser conduzida através da via nervosa auditiva até ao córtex cerebral (Necker, 2000).

2.1.1. Ouvido externo

Esta primeira porção do aparelho auditivo constitui a entrada do ouvido até ao tímpano e tem como principais funções a receção e canalização do som para o ouvido médio. Visto não existir *pinnae* ou orelha em aves, este engloba apenas o meato acústico externo e o tímpano.

2.1.1.1. Ausência de *Pinnae*

O ouvido externo de uma ave é uma estrutura discreta, não possuindo *Pinnae* ou pavilhão auricular característico dos mamíferos. Em vez disso possuem penas especializadas que protegem o canal auricular ao mesmo tempo permitindo a passagem do som (Gill, 2007). Estas penas especializadas ao redor da entrada do ouvido não possuem bárbulas (ramificações secundárias das penas) que reduzem o atrito em voo minimizando a turbulência. A diminuição da turbulência permite por sua vez otimizar a percepção sonora, já que na presença desta há distorção dos sons recebidos. Além disso estas penas estão também orientadas de forma a atuar como um funil, direcionando o som para o canal auditivo (Coles, 2007).

Algumas espécies de corujas possuem especializações como pregas de pele na entrada do ouvido e discos-faciais que ajudam a refletir, amplificar e direcionar o som para a periferia da cabeça até ao meato acústico externo. Podem também possuir entradas dos meatos assimétricas e em direções diferentes que lhes aumentam a capacidade de localização de som (Necker, 2000; Coles, 2007).

2.1.1.2. Meato acústico externo

Debaixo das penas especializadas encontra-se a entrada para o meato acústico externo, localizada lateralmente na cabeça, numa posição caudo-distal relativamente aos olhos. Esta entrada é tipicamente mais pequena que a membrana timpânica, poderá ser circular ou oval e apresenta uma orientação oblíqua em relação à base do canal. O canal em si é uma estrutura tubular, circular e relativamente curta (2 a 7 mm), que transporta as ondas sonoras do ar circulante até ao tímpano. O epitélio que o reveste é a continuação do epitélio da porção externa da membrana timpânica. A sua forma, comprimento e diâmetro variam consoante a espécie.

Esta estrutura tem como função a proteção da membrana timpânica e no geral não contribui para a amplificação do som com exceção de algumas aves de rapina (Falconiformes), os corvos e as gralhas (Corvidae) e corujas (Estrigiformes) que podem apresentar um ligeiro aumento de 1 a 4 dB entre o intervalo de frequências de 0,5 a 6 kHz (Saunders *et al.*, 2000; Coles, 2007).

2.1.1.3. Tímpano

O tímpano é uma estrutura oval membranosa, orientada quase verticalmente, localizada no final do meato acústico externo que demarca a transição do ouvido externo para o ouvido médio. Esta membrana é parte fundamental no efeito de amplificação sonora do ouvido

médio que será discutido mais à frente. É constituído por duas camadas epiteliais, uma exterior com continuidade com o meato acústico externo e uma interior com continuidade com o epitélio de revestimento da cavidade timpânica. No meio destas possui uma camada constituída essencialmente por tecido fibroso (Meyer, 1986).

As aves não apresentam nenhuma estrutura semelhante ao anel timpânico dos mamíferos, encontrando-se a membrana timpânica firmemente suportada por estruturas ósseas que formam os limites da cavidade timpânica (Saunders, 1985; Saunders, *et al.* 2000).

Este projeta-se para o interior do meato de forma cônica, ao contrário do que sucede nos mamíferos. Esta aparência convexa é causada por uma protusão do processo cartilaginoso do ossículo do ouvido médio.

As ondas sonoras provenientes do meato, ao entrar em contacto com o tímpano fazem-no vibrar com a mesma frequência das ondas recebidas e a uma amplitude determinada pela intensidade do som (Meyer, 1986; Saunders, *et al.* 2000).

2.1.2. Ouvido Médio

O ouvido médio é constituído pela cavidade timpânica juntamente com todas as estruturas no seu interior. Estas estruturas incluem a porção interior da membrana timpânica, os constituintes da columela e extracolumela, o sistema suspensor geral constituído por ligamentos, o músculo do ouvido médio e o órgão paratimpânico (Meyer, 1986; Saunders *et al.*, 2000).

O ouvido médio das aves possui um mecanismo semelhante ao de um pistão que tem como principal objetivo a transdução das ondas sonoras que alcançam e fazem vibrar o tímpano em ondas de fluxo que se irão propagar no fluído da cóclea, funcionando como um transformador de impedância (Coles, 2007; Köppl, 2015).

2.1.2.1. Cavidade timpânica

Entre o tímpano e o ouvido interno situa-se a cavidade timpânica. Esta é grande relativamente ao tamanho da cabeça, encontra-se cheia de ar e tem uma forma irregular. Está rodeada de estrutura ósseas com exceção da parede ventro-lateral onde se encontra a membrana timpânica e está recoberta por uma camada epitelial que é a continuação da porção interna do tímpano.

Os ouvidos médios em aves não se encontram limitados por uma bula timpânica como sucede nos mamíferos estando ligados acusticamente através de espaços cheios de ar no crânio denominados coletivamente canal interaural. Parte deste canal é formado pelos tubos de Eustáquio que se abrem na cavidade bucal. Assim há uma comunicação entre as duas

cavidades do ouvido médio, dos dois lados da cabeça, e entre uma abertura comum para a faringe. Estas ligações vão permitir que ondas sonoras provenientes de ambos os lados da cabeça alcancem os dois tímpanos o que terá implicações ao nível da localização sonora (Saunders *et al.*, 2000; Köppl, 2015).

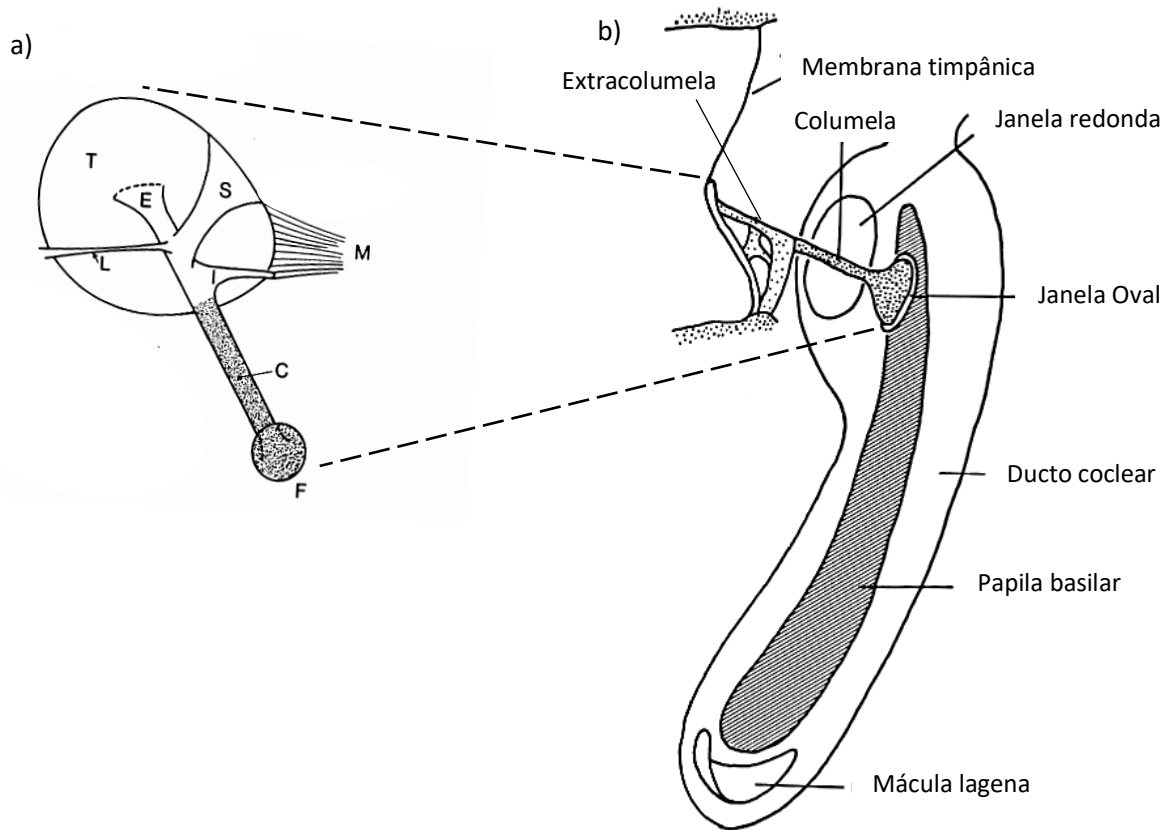
2.1.2.2. Columela

Em contraste com os mamíferos que apresentam três ossículos (martelo, bigorna e estribo) no seu ouvido médio, as aves possuem apenas um, a columela, que apresenta uma continuação lateral cartilaginosa, a extracolumela.

A columela em aves é equiparável ao estribo nos mamíferos; consiste numa estrutura fina e alongada que termina medialmente numa base oval que se insere na janela oval da cóclea (Figura 1-b) e aí é suportada pelo ligamento anular (Meyer, 1986). É oca contendo apenas alguma medula no seu interior. Apesar da sua massa reduzida tem bastante capacidade de retenção de força devido aos buracos, cristas e sulcos presentes na sua superfície (Saunders *et al.*, 2000).

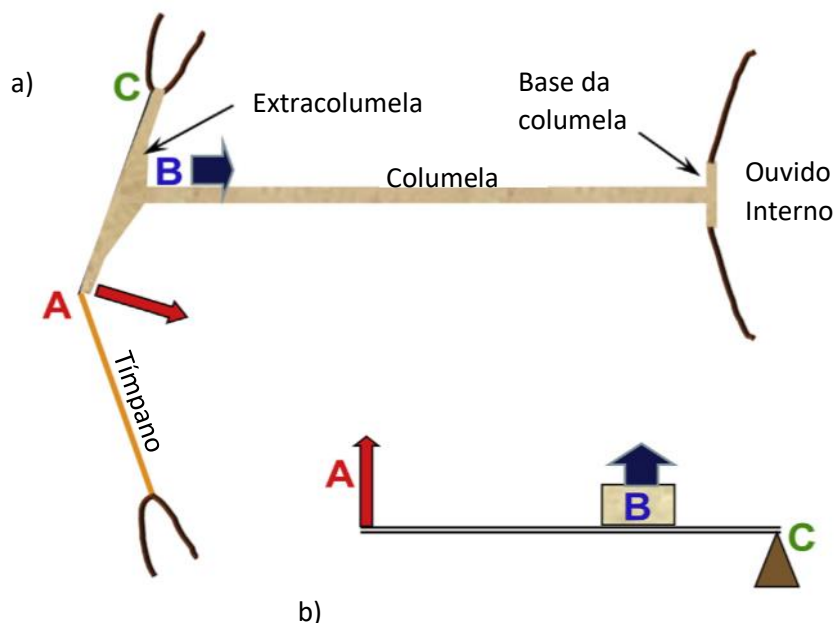
Progredindo lateralmente esta estrutura encontra-se ligada à extracolumela, aproximadamente a metade do comprimento da mesma a um ângulo quase reto (Figura 1-b), por meio de uma sincondrose (Saunders, 1985; Köppl, 2015). A extracolumella está em contacto com o tímpano por meio de três processos cartilagosos (infracolumelar, supracolumelar e extracolumelar) que se encontram dispostos em ângulo reto em relação uns aos outros, formando um suporte em forma de Y (Figura 1). Esta disposição permite a estabilização da columela e o aumento da tensão da membrana timpânica (Saunders *et al.*, 2000). O processo cartilaginoso infracolumelar liga a periferia do tímpano ao seu centro e é possivelmente a parte mais importante desta estrutura. Este processo, após estimulação do tímpano por ondas sonoras, inclina-se sob o seu fulcro exercendo força na columela. Assim, graças à flexibilidade da extracolumela, desencadeia-se um mecanismo de alavanca que vai provocar um movimento da columela semelhante ao de um pistão (Figura 2) (Köppl, 2015).

Figura 1 – a) Ilustração esquemática do ouvido médio e ducto coclear típico de uma ave (Adaptado de Necker, 2000). b) Representação da relação entre a columela e a membrana timpânica de outra perspectiva (Adaptado de Meyer, 1986).



É visível a ligação do ducto com o tímpano através da columela e extracolumela. Dentro do ducto coclear são distinguíveis dois órgãos de células ciliadas sensoriais: a papila basilar e mácula lagena. Nesta figura não é demonstrada a porção vestibular do ouvido interno. C- Columela; F- Base da columela; E- Processo extracolumelar; I- Processo infracolumelar; S- Processo supracolumelar; L- Ligamento escamoso-columelar; M- Músculo columelar; T- Membrana timpânica.

Figura 2 – a) Representação esquemática do ouvido médio e seu funcionamento numa ave. b) Mecanismo de alavanca de segunda classe (Adaptado de Köppl, 2015).



a) A extracolumela está flexivelmente aderida à membrana timpânica de forma que o movimento do tímpano para dentro provoca um movimento semelhante ao de um pistão ao nível da base da columela. b) A força resistente [B] está entre o fulcro ou eixo de rotação [C] e a força potente [A]. O comprimento das setas é proporcional à amplitude do deslocamento e a grossura à força por detrás do movimento. Assim, no ponto B, o deslocamento é mais pequeno que no A mas a força é proporcionalmente maior.

O facto de a columela se inserir a aproximadamente metade do comprimento da extracolumela amplifica a força transmitida por esta alavanca através do tímpano. Isto, juntamente com o facto de a área da membrana timpânica ser bastante maior que a área da base da columela, resultam na amplificação da pressão sonora que vai permitir a propagação das ondas no fluido do ouvido interno (Saunders *et al.*, 2000). Assim o ouvido médio funciona como um mecanismo transformador de impedância permitindo que o som proveniente do ar, um meio de baixa impedância, altere de forma eficiente a pressão quando alcança um meio de elevada impedância, o líquido do ouvido interno. Sem este mecanismo o ouvido interno seria cerca de 40 dB menos sensível (Gummer *et al.*, 1989).

2.1.2.3. Músculo Columelar

As aves possuem apenas um músculo no seu ouvido médio, homólogo dos músculos tensor do tímpano e estapédio em mamíferos, denominado columelar (Kuhne & Lewis, 1985). Este

apresenta-se inserido no osso occipital e no tímpano. A contração deste músculo resulta num aumento da tensão da membrana em determinadas zonas e num aumento de complacência em outras. Isto vai fazer com que o sistema da columela se mova na direção da membrana timpânica, distanciando a base da columela da janela oval (Saunders *et al.*, 2000). Assim a ativação deste músculo resulta numa redução da resposta elétrica da cóclea. Este efeito depende da frequência, sendo que a atenuação ocorre a frequências mais baixas ou mais elevadas que o espectro auditivo de maior sensibilidade (Necker, 2000). No entanto, o aumento da tensão do complexo columelar derivado da contração deste músculo irá provavelmente aumentar a capacidade de equivalência da impedância do ouvido médio. As funções associadas a este músculo são variadas, apesar de algumas não estarem ainda comprovadas. Entre elas: ativação como parte de um reflexo acústico, proteção de auto-vocalizações, atenuação de frequências de mascaramento para comunicação, proteção do som do vento de baixa frequência durante o voo e providenciar o sistema de retroação necessário para o desenvolvimento vocal (Saunders *et al.*, 2000).

2.1.2.4. Ligamentos

Nas aves estes ligamentos são os ligamentos de tambor-tubais e de tambor intrínsecos que se encontram inseridos na periferia e na membrana timpânica propriamente dita e servem essencialmente para ligar o tímpano aos ossos da periferia mantendo a membrana tensa. Possuem também o ligamento de Platner, que se insere na junção entre os processos cartilaginosos supra e extra-columelar terminando em estruturas ósseas envolventes. Este ajuda a manter a membrana imóvel e independente dos movimentos da mandíbula (Saunders *et al.*, 2000).

No geral estes servem para estabilizar e manter a posição da membrana timpânica e sistema columelar. Além disto providenciam a força elástica necessária para que estas estruturas regressem à sua posição de descanso, após a ativação do músculo do ouvido médio (Saunders, 1985).

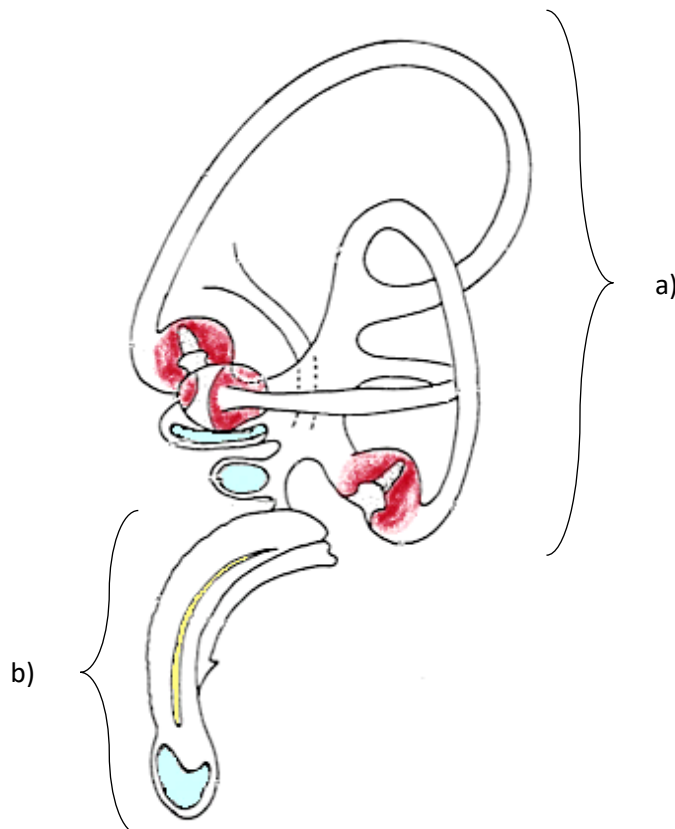
2.1.2.5. Órgão Paratimpânico

O órgão paratimpânico é um pequeno órgão sensitivo do ouvido médio das aves, encontrando-se próximo da membrana timpânica (Jørgensen, 1984). Este órgão oco possui a forma de um tubo longo que contém mecanoreceptores (células ciliadas) na sua parede medial, com terminações nervosas aferentes e eferentes do nervo facial. Apesar das suas funções serem ainda desconhecidas existem evidências de que poderá detetar pressões barométricas. Informação barométrica em aves poderá ser particularmente importante para, por exemplo, prever tempestades (Bartheld, 1994; Necker, 2000).

2.1.3. Ouvido Interno

O ouvido interno é responsável pela transdução da energia mecânica que alcança o ouvido interno através da janela oval (Figura 1-b), em energia elétrica permitindo que a informação sonora viaje até ao SNC onde será processada. Além disto é também responsável pela manutenção do equilíbrio. Estas diferentes funções são atribuídas aos dois órgãos pertencentes a este aparelho, o coclear e o vestibular, respetivamente. Enquanto a mácula (utricular, sacular e lagena) e a ampola dos canais semicirculares fazem parte do órgão vestibular (Figura 3-a) e têm como principal função a manutenção do equilíbrio, o órgão coclear contém a papila basilar como epitélio sensitivo para a função auditiva (Figura 3-b). Estruturalmente, o ouvido interno é constituído por dois labirintos, um ósseo e um membranoso, onde se situa todo o epitélio sensitivo, sendo este último encapsulado pelo ósseo. Ambos são complexos e preenchidos por líquido, nomeadamente perilinfa no ósseo e endolinfa dentro do membranoso (Meyer, 1986; Necker, 2000).

Figura 3 – Ilustração do labirinto membranoso de uma ave distinguindo-se o aparelho vestibular (a) e o coclear (b) (Adaptado de Meyer, 1986).



Estão demonstradas as posições relativas das áreas sensitivas, nomeadamente as cristas ampulares (a vermelho), mácula vestibular (a azul) e papila basilar (a amarelo).

2.1.3.1. Cóclea

A cóclea de uma ave é uma estrutura óssea tubular, ligeiramente curvada medialmente e torcida, sendo que as cócleas de ambos os lados da cabeça se aproximam junto à base do crânio. Ao contrário da estrutura em espiral característica dos mamíferos, nas aves a cóclea está relativamente alinhada (Figura 3-b).

Regra geral esta estrutura é relativamente pequena, tendo um comprimento médio de 7 mm. Apesar disto o comprimento pode variar consoante a espécie, sendo cerca de 3 mm em aves canoras e podendo atingir os 12 mm em algumas corujas.

No seu interior está dividida em três cavidades: escala vestibular, escala timpânica e escala média (Figura 4). Possui duas entradas viradas para a cavidade timpânica, a anteriormente mencionada janela oval, onde contacta com o ouvido médio e em posição mais distal a janela redonda (Figura 1-b) (Necker, 2000; Gleich & Manley, 2000).

2.1.3.2. Ducto Coclear

O ducto coclear é composto por diferentes especializações epiteliais e encerra o espaço endolinfático da escala média. De cada lado do ducto coclear encontram-se espaços perilinfáticos: uma estreita escala vestibular do lado da janela oval e uma escala timpânica, mais larga, do lado da janela redonda. Estas comunicam entre elas na sua base e ápex (helicotrema), que possibilita um sistema ininterrompido de circulação de perilinfa, permitindo compensar as alterações de volume. Os elementos epiteliais principais do ducto coclear são a papila basilar e o *tegmentum vasculosum*. A terminação distal do ducto é ocupada pela mácula lagena (Figura 1-b), que já foi mencionada como pertencente ao labirinto vestibular (Meyer, 1986; Necker, 2000).

2.1.3.3. *Tegmentum vasculosum*

O *tegmentum vasculosum* é uma estrutura, provavelmente homóloga à *stria vascularis* dos mamíferos, espessa e altamente vascularizada, que se salienta no ducto coclear, separando a escala média da escala vestibular. Este é composto por dois tipos de células diferentes, claras e escuras, que se acredita estarem altamente especializadas para secreção ativa e absorção, respetivamente. Esta estrutura providencia o isolamento químico e elétrico da papila basilar (Saito, 1983; Meyer, 1986; Necker, 2000).

2.1.3.4. Papila basilar

A papila basilar pode ser considerada a estrutura sensitiva principal do ouvido interno, na função auditiva e consiste essencialmente num neuroepitélio constituído por células ciliadas sensitivas.

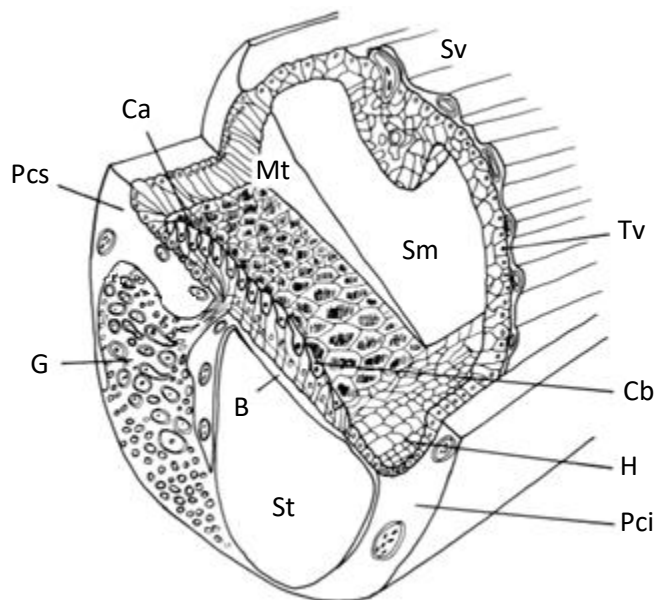
Esta estrutura sofre um estreitamento sendo mais larga perto da ponta apical e mais estreita na ponta basal (Figura 1-b) (Saito, 1980). Em aves é regra geral mais curta (menos de 4 a 5 mm) e mais larga que em mamíferos. O número total de células ciliadas varia entre alguns milhares em aves canoras (p.e. 5 800 no estorninho) até 16 000 em algumas corujas (Gleich, 1988; Köppl, 2015).

As células ciliadas sensitivas encontram-se intercaladas com células colunares de suporte organizadas de forma hexagonal ao redor das células sensitivas. Na periferia da papila encontram-se células hialinas (Meyer, 1986).

O neuroepitélio assenta-se indiretamente, através das células colunares de suporte, sobre a membrana basal (Knight, 1968). Esta membrana é bastante elástica estando em grande parte suspensa sobre o fluído da escala timpânica (Figura 4). Em contraste o lado apical das células encontra-se firmemente fixo à rígida membrana tectorial. Estas características de fixação vão resultar numa oscilação da membrana basal em contraposição à membrana tectorial, que se vai propagar da base para o ápice da papila, formando a denominada onda viajante.

A amplitude de oscilação varia com a variação das propriedades mecânicas da membrana basal e com a própria natureza do neuroepitélio, que se encontra organizado tonotopicamente (Meyer, 1986). Isto significa que o local de amplitude máxima da oscilação vai depender da frequência do estímulo, após o qual a amplitude de vibração da membrana desce abruptamente (Köppl, 2015). Frequências mais baixas provocam deslocamento máximo na porção apical da membrana enquanto as frequências altas irão provocar um efeito semelhante a nível basal. Este é o primeiro mecanismo de discriminação de frequência do aparelho auditivo (Gleich & Manley, 2000).

Figura 4 – Representação tridimensional de corte transversal do ducto coclear na região mais apical (região de maior sensibilidade a baixas frequências da papila basilar) (Adaptado de Necker, 2000).



Sv- Escala vestibular; Sm- Escala média; St- Escala timpânica; Ca- Células ciliadas altas; Cb- Células ciliadas baixas; H- Células hialinas; G- Gânglio coclear; B- Membrana basal; Pcs- Placa cartilaginosa superior; Pci- Placa cartilaginosa inferior; Mt- Membrana tectorial; Tv- *Tegumentum vasculosum*.

2.1.3.5. Células ciliadas

As células ciliadas sensitivas compõem a maior parte do epitélio da papila basilar e estão cobertas por uma barreira de estereocílios, que por sua vez se encontra revestida por uma estrutura acelular proteica, a membrana tectorial (Meyer, 1986; Köppl, 2015). As células estão firmemente aderidas a esta membrana (Saito, 1980).

Uma célula ciliada caracteriza-se por possuir numerosos estereocílios que sobressaem na sua placa cuticular, o lado apical da célula. Existe também um cinocílio no sentido do qual os estereocílios aumentam de altura (Figura 6) (Takasaka & Smith, 1971).

É considerado que existem dois tipos de células sensitivas, as altas e as baixas. Em aves há uma transição progressiva entre estes dois tipos de células (ao contrário do que acontece em mamíferos, nos quais estão nitidamente separadas) considerando-se também a existência de um tipo intermédio (Figura 5) (Köppl, 2015).

As células ciliadas altas localizam-se tendencialmente na zona apical da papila e os seus feixes têm relativamente pouco estereocílios e as baixas encontram-se na zona mais basal e

têm feixes geralmente compostos por relativamente mais estereocílios. Esta localização está relacionada com a organização tonotópica das células (Figura 5).

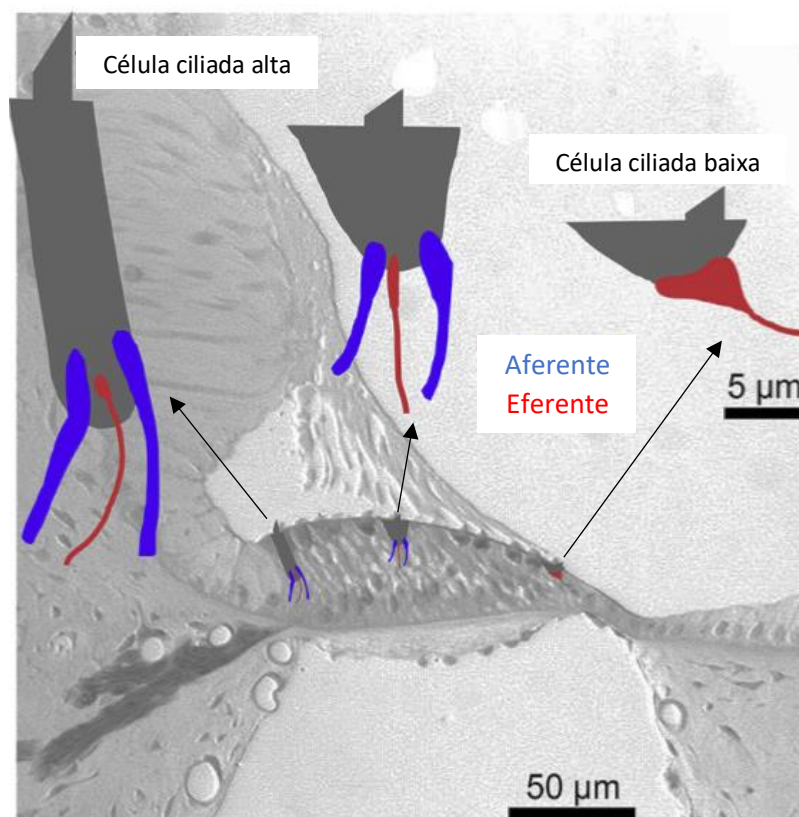
Células de zonas mais apicais têm sensibilidade máxima a baixas frequências, tipicamente até aos 100Hz, e células de zonas mais basais têm sensibilidade máxima a frequências mais altas, normalmente entre 5-8 kHz.

A sincronização elétrica das células é conseguida variando o número e/ou a cinética dos dois canais iónicos principais da membrana das células ciliadas: canais de ião cálcio (Ca^{2+}) dependentes da voltagem e de potássio (K^+) ativado (Figura 7) (Köppl, 2015).

Outra diferença significativa entre estes dois tipos celulares é o tipo de neurónios com que estas têm contacto. As células da zona basal recebem muitas terminações eferentes mas estão privadas de inervação aferente. Tal como nos mamíferos, nas aves as células altas têm elevado contacto com neurónios aferentes (Figura 5), assumindo o papel sensorial clássico da audição e as curtas são especializadas em amplificação mecânica.

Uma característica marcante da papila auditiva das aves é que 20-25% das células ciliadas não estão em contacto com neurónios aferentes. Em contraste, todas as células estão em contacto com neurónios eferentes localizados na porção ventral do tronco cerebral (Gleich & Manley, 2000; Köppl, 2015).

Figura 5 – Imagem da papila basilar com representação esquemática das células ciliadas e a sua inervação (Adaptado de Köppl, 2015).



O fundo é uma imagem de microscópio ótico de um corte transversal da papila na região mais basal (mais sensível a altas frequências). Nesta imagem estão destacadas três células na papila basilar, que se apresentam aumentadas para distinguir melhor o tipo de inervação dos diferentes tipos celulares. A célula que se encontra a meio da papila poderá representar um tipo de célula intermédia. A inervação aferente é apresentada a azul e a eferente a vermelho. A zona mais apical da papila é representada pela extremidade mais larga, em contraposição com a zona basal, que corresponde à extremidade mais estreita.

2.1.3.6. Mecanismo de transdução

A ativação das células ciliadas resulta das forças de cisalhamento da membrana tectorial a atuar nos cinocílios durante as oscilações da membrana basal, provocadas pelo som. As células ciliadas estão polarizadas eletricamente com uma carga negativa no seu interior. O espaço endolinfático (escala média), por sua vez, apresenta um potencial positivo, aumentando a diferença de potencial ao longo da superfície apical das células.

O potencial positivo do espaço endolinfático deve-se a uma elevada concentração de K^+ segregado pelo *tegmentum vasculosum*.

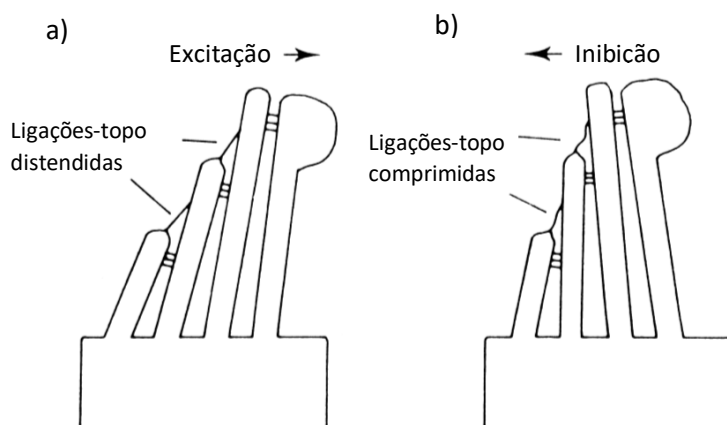
Quando o cinocílio é dobrado pelos movimentos da membrana tectorial, os estereocílios acompanham o movimento com a ajuda das ligações-topo, que ficam distendidas (Figura 6-a). Isto vai provocar a abertura dos canais de K^+ mecanossensitivos activados, aumentando a concentração deste ião no interior da célula.

Após o influxo de K^+ para o interior da célula e despolarização da membrana ocorre um influxo de Ca^{2+} por ativação dos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem. Este Ca^{2+} por sua vez irá desencadear a libertação das vesículas com neurotransmissor, neste caso o glutamato, desencadeando um potencial de ação (Figura 7).

Nas aves, o influxo de Ca^{2+} vai também ativar canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} provocando uma hiperpolarização da célula. Acredita-se que este mecanismo poderá ser a base das oscilações do potencial da membrana das quais resulta a sincronização elétrica das células ciliadas que sucede nestes animais (Necker, 2000).

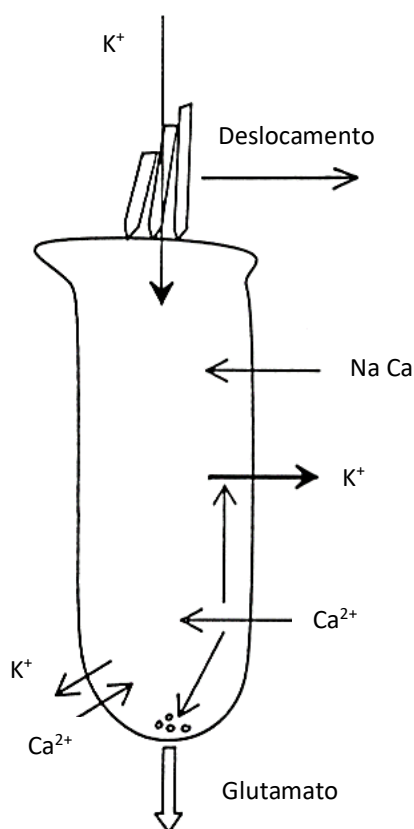
Estas células têm também a capacidade interessante de fazer transdução reversa, ou seja, têm a capacidade de gerar forças mecânicas e amplificar ativamente estímulos de baixa intensidade. Isto é confirmado pelo facto de se conseguir registar nestes animais as emissões otoacústicas que em mamíferos resultam deste fenómeno, apesar de a origem exata deste mecanismo em aves ainda ser desconhecida (Köppl, 2015).

Figura 6 – Representação esquemática da organização das ligações-topo dos estereocílios de células ativadas (a) e em descanso (b) (adaptado de Necker, 2000).



O cinocílio inclina-se consoante os movimentos da membrana tectorial, em oposição aos movimentos da membrana basal. Os estereocílios inclinam-se na mesma direção, auxiliados pelas ligações-topo. Na fase de excitação ocorre um estiramento das ligações, ocorrendo o contrário em caso de inibição.

Figura 7 – Fluxo de iões na fase de excitação de uma célula ciliada (adaptado de Necker, 2000).



A entrada de K^+ e Ca^{2+} culminam na liberação do neurotransmissor glutamato.

2.2. Sistema nervoso auditivo central

Os caminhos nervosos auditivos principais de uma ave são semelhantes aos da maioria dos vertebrados terrestres. A maioria das vias aferentes partem do núcleo coclear e passam, direta ou indiretamente, pelos núcleos do tronco cerebral, oliva superior e leminísco lateral, e daí para o núcleo colículo inferior (mesencefálico lateral pars dorsal em aves) do mesencéfalo. Desta parte do encéfalo partem projeções para núcleos no tálamo e daí para o prosencéfalo. Além deste padrão geral, os núcleos e suas subdivisões podem variar significativamente entre grupos de vertebrados (Köppl, 2015).

2.2.1. Via nervosa auditiva aferente

As células ciliadas são células sensoriais secundárias, não possuindo um axónio. Elas estão em contacto com os dois tipos básicos de neurónios, aferente e eferente ao SNC. Os neurónios aferentes possuem os seus corpos celulares num gânglio compacto próximo da papila basilar denominado gânglio coclear (Figura 4). As suas fibras periféricas entram na papila através do seu bordo neural e tipicamente contactam com uma célula cada uma (Köppl, 2015).

Os aferentes cocleares juntam-se ao nervo auditivo (VIII par craniano), formando o ramo coclear, e entram na medula oblonga onde se ramificam para alcançar o núcleo magnocelular (NM) e o núcleo angular (NA), este último numa posição rostral ao anterior (Figura 8). Estes núcleos são provavelmente os pontos de partida para vários caminhos de processamento auditivo especializados em diferentes aspetos (Carr & Code, 2000; Meyer, 2000).

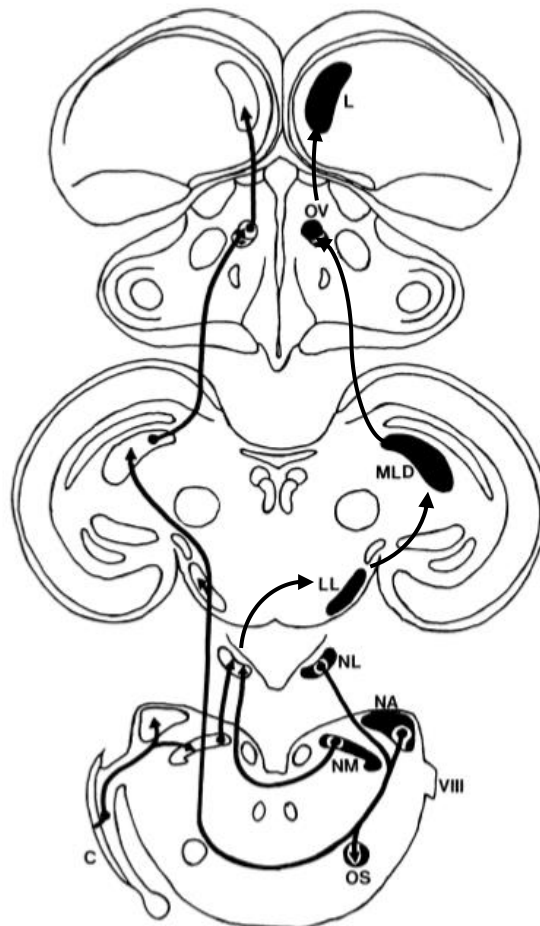
O NM é o mais simples dos dois, possuindo um tipo predominante de neurónio especializado em preservar ou amplificar a informação temporal funcionando como ponto de partida para o “caminho temporal”. A função mais conhecida deste caminho é a extração das diferenças de tempo interaural usadas na localização do som (Carr & Boudreau, 1993; Carr & Code, 2000). Este núcleo projeta neurónios bilateralmente para o núcleo laminar (NL) no metencéfalo (Figura 8), sendo este último o primeiro núcleo a receber informação proveniente de ambos os ouvidos e o principal responsável pela deteção de diferenças de tempo interaural (Carr & Code, 2000; Meyer, 2000).

O NA parece ser o ponto de origem de tudo o resto, genericamente denominado o “caminho de intensidade”. Este núcleo contém vários tipos celulares com diferentes propriedades anatómicas e fisiológicas (Köppl, 2015). Os neurónios que partem daqui projetam-se essencialmente contralateralmente em direção ao núcleo mesencefálico lateral pars dorsal (MLD) no mesencéfalo (considerado homólogo do colículo inferior nos mamíferos), emitindo colaterais para o oliva superior (OS) e para o núcleo leminisco lateral (LL) no metencéfalo. O

NL tem projeções de neurónios contralaterais semelhantes ao NA. A OS emite projeções para o MLD. Grande parte das projeções do LL vão para o MLD (Figura 8).

O MLD está organizado num núcleo central (ICc) e num núcleo externo (ICx) e é aqui que toda a informação aferente auditiva converge. Apesar de haver comunicação entre os MLDs contralaterais, a partir daqui as projeções são essencialmente ipsilaterais para o núcleo ovoidal (Ov) no tálamo e daí para o campo L no prosencéfalo (Figura 8), dividido em sub-regiões sendo a mais importante a L2 por ser a principal recetora das fibras provenientes do tálamo. A organização tonotópica, iniciada nas células ciliadas da cóclea, mantém-se ao longo dos núcleos do tronco cerebral até alcançar o campo L (homólogo ao córtex dos mamíferos) (Köppl, 2015; Meyer, 2000).

Figura 8 – Diagrama do caminho nervoso auditivo ascendente com a localização dos principais núcleos nervosos auditivos (Adaptado de Necker, 2000).



C – Cóclea; L – Campo L; LL – Núcleo lemnisco lateral; MLD – Núcleo mesencefálico lateral pars dorsal; NA – Núcleo angular; NL – Núcleo laminar; NM – Núcleo magnocelular; OS – Oliva superior; Ov – Núcleo ovoidal; VIII – Nervo auditivo (VIII par craniano)

2.2.2. Neurónios eferentes cocleares

O sistema auditivo eferente refere-se ao conjunto de neurónios no tronco cerebral que envia axónios descendentes até a cóclea. Os neurónios que se projetam para a papila estão localizados bilateralmente numa coluna que se estende ao longo do rombencéfalo, começando no núcleo olivar superior e projetam-se principalmente contralateralmente.

Os terminais destes neurónios possuem acetilcolina, assim como sucede em mamíferos. Estes estão provavelmente envolvidos na modulação da entrada de informação aferente. A ativação destes neurónios parece estar associada a inibição da resposta do nervo auditivo e a um aumento dos limiares auditivos, possivelmente servindo como mecanismo de proteção (Carr & Code, 2000).

3. Avaliação Auditiva

Audição pode ser definida como a capacidade de receber e interpretar informação sonora que alcança o aparelho auditivo a uma frequência e intensidade audíveis.

O sentido da audição em animais pode ser estudado usando uma abordagem anatômica, fisiológica ou comportamental e cada método tem as suas vantagens e desvantagens.

A maior parte dos dados existentes são resultado de procedimentos da área comportamental ou psicoacústica, que correspondem aos meios mais apropriados para uma avaliação mais completa das capacidades auditivas. (R. Dooling, 2002; R. J. Dooling, Fay, et al., 2000) Através de treino um pássaro pode ser ensinado a indicar a deteção de sons de frequência e intensidades conhecidas.

No entanto estes estudos são difíceis e laboriosos. Outra forma de conseguir dados, que não requer o treino dos animais, é através de técnicas eletrofisiológicas como registo direto de respostas evocadas auditivas. (Martin, 2017)

3.1. Respostas Evocadas Auditivas (REA)

Audiometrias eletrofisiológicas baseiam-se na deteção de respostas evocadas auditivas. Estas, também denominadas potenciais evocados auditivos, representam atividade bioelétrica desencadeada por estímulos sonoros provocados por um sistema de audiometria. Após a sua deteção e processamento, pelo mesmo sistema, esta atividade é registada num gráfico de ondas sob a forma de flutuações de voltagem que assinalam a passagem do estímulo, ao longo do tempo, pelas diferentes partes do sistema nervoso auditivo. (Goldstein & M.Aldrich, 1999; Hall, 2015)

3.1.1. Classificação de REA

O tempo que demora desde a apresentação do estímulo até ao surgimento de uma resposta (latência) define a classificação da resposta evocada auditiva. (Bess & Humes, 2008) Estas

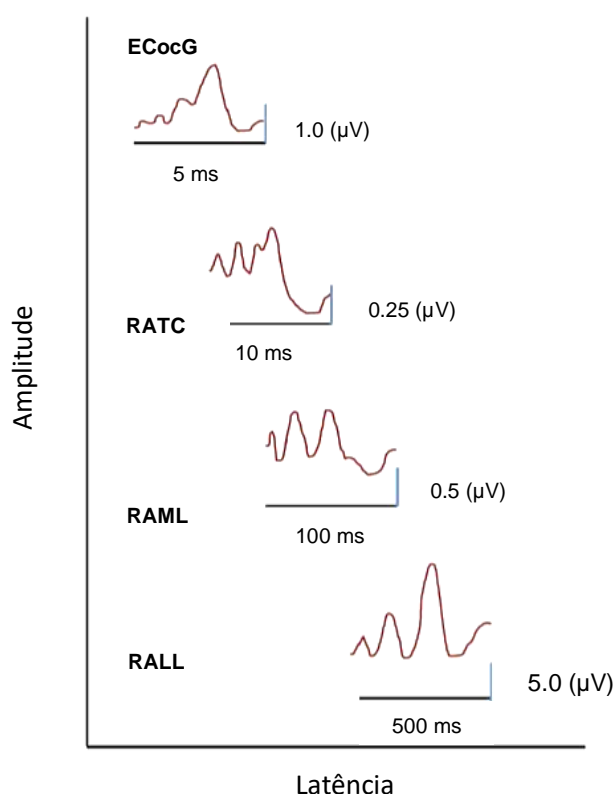
são então classificadas como respostas de curta, média ou longa-latência; todas sucedem dentro de 1 segundo após o estímulo (Gráfico 2).

As respostas de curta-latência englobam a electrococleografia (ECocG) e a resposta auditiva do tronco cerebral (RATC). Em seres humanos a primeira sucede tipicamente nos primeiros 2 a 3 ms e engloba as respostas geradas pela cóclea e nervo auditivo (VII par craniano) enquanto a RATC surge entre os 3 a 15 ms e é gerada por parte do nervo auditivo e pelo tronco cerebral. (Brittan-Powell et al., 2002; Hall, 2015)

Respostas que surgem de regiões craniais ou rostrais ao tronco cerebral aparecem com latências mais longas após estimulação. No intervalo entre os 15ms e os 50ms surgem os componentes mais importantes das respostas auditivas de média latência (RAML) que são desencadeadas por estruturas entre o tálamo e córtex cerebral.

As respostas auditivas de longa latência (RALL), correspondentes a respostas do córtex cerebral, surgem em latências entre os 100 e os 300ms. (Hall, 2015; Burkard & Don, 2015)

Gráfico 2 – Representação dos diferentes tipos de respostas evocadas auditivas em humanos (Adaptado de Hall, 2015).



ECocG – Electrococleografia; RATC – Resposta Auditiva do Tronco Cerebral; RAML – Resposta Auditiva de Média Latência; RALL – Resposta Auditiva de Longa Latência.

3.1.2. Aplicações e vantagens de REA em relação a estudos comportamentais

As técnicas de deteção de respostas evocadas auditivas, em geral, providenciam uma avaliação da função auditiva principalmente em duas áreas abrangentes de aplicação:

determinação do grau de perda auditiva e a estimativa de limiares de sensibilidade auditiva em populações difíceis de testar de outra forma. A deteção de RATC é atualmente a técnica mais utilizada para ambas estas áreas (Burkard & Don, 2015).

Estas funcionam também como um método de diagnóstico eletrofisiológico que fornece informação que permite aferir acerca da integridade neurofisiológica, mais especificamente sincronia neuronal, de estruturas do caminho nervoso auditivo. Assim estes testes podem ser aplicados em áreas como determinação de doenças do foro neurológico, diferenciação entre tipos de perda auditiva e monitorização intracirúrgica de estruturas do caminho nervoso auditivo.

No entanto, a principal aplicação parece ser a estimativa da sensibilidade auditiva, através da determinação de limiares auditivos, em pacientes incapazes de fornecer uma resposta comportamental voluntária à apresentação de um estímulo. Esta é também a grande vantagem da audiometria eletrofisiológica em relação à audiometria comportamental.

Outras vantagens são: a maior objetividade destas técnicas em relação às tradicionais técnicas de avaliação auditiva comportamental, pois não depende de uma resposta comportamental subjetiva; possibilidade de poder fazer o teste sob sedação ou anestesia geral, o que é ideal para possibilitar a contenção em animais (Bess & Humes, 2008; Goldstein & M.Aldrich, 1999); o facto de não haver necessidade de treinar os animais, tornando o teste mais rápido e viável em animais para os quais o treino não é uma opção (Lohr, Brittan-Powell, & Dooling, 2013).

3.2. Resposta Auditiva do Tronco Cerebral (RATC)

O que se pretende medir com este teste é a manifestação elétrica resultante da ativação das estruturas excitadas, do nervo auditivo ao tronco cerebral, pelo estímulo sonoro, ao longo do tempo. Neste processo de medição, existem alguns obstáculos à deteção da resposta desejada a ser ultrapassados como: o facto de a atividade que estamos a detetar ser extremamente pequena (na ordem dos microvolts); o facto de não ser a única a ser produzida e portanto detetada a dado momento, existindo sempre atividade elétrica de fundo correspondente ao Eletroencefalograma (EEG) e potenciais musculares ou até ocasionalmente interferência elétrica exterior ao animal; o facto de a fonte da atividade (VII nervo craniano e tronco cerebral) que queremos medir se encontrar a uma distância considerável do local onde vai ser detetada pelo eléctrodo, que se encontra à superfície da pele (Hall, 2015; Burkard & Don, 2015).

Para contornar estes obstáculos o sinal tem de ser amplificado, filtrado e somado para realização de uma média dos sinais de modo a extrair as respostas neurológicas ligadas temporalmente à apresentação do estímulo de entre a restante atividade de fundo que ocorre aleatoriamente (Bess & Humes, 2008).

3.2.1. RATC em aves

Existe bastante informação relativamente à audição das aves baseada em estudos comportamentais. Contudo, a realização de testes comportamentais não é possível em todas as aves (aves jovens, aves silvestres ou selvagens).

Nas últimas décadas a deteção de RATC tem sido usada como ferramenta para o estudo da funcionalidade do sistema auditivo numa grande variedade de classes de vertebrados. Estas respostas têm-se mostrado semelhantes nos diferentes animais testados. Alguns estudos ajudaram já a mostrar o valor desta técnica para avaliação da função do sistema auditivo periférico e para a estimativa de limiares auditivos nesta classe de animais. (Aleksandrov & Dmitrieva, 1992; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002; Brittan-Powell, Dooling, Ryals, & Gleich, 2010a; Brittan-Powell, Lohr, Hahn, & Dooling, 2005; K. S. Henry & Lucas, 2009; J. R. Lucas, Freeberg, Krishnan, & Long, 2002; Noirot, Brittan-Powell, & Dooling, 2011a)

Como já foi mencionado anteriormente, a maioria das aves ouve melhor no intervalo de frequências entre 1 – 5 kHz, com sensibilidade absoluta entre os 0 – 10 dB SPL na frequência de melhor audição que se encontra tipicamente entre os 2 – 3 kHz (Brittan-Powell et al., 2002; R. J. Dooling, Lohr, et al., 2000). No entanto, algumas espécies de corujas possuem melhor audição para frequências mais elevadas. Nas corujas do mato, por exemplo, o intervalo de maior sensibilidade é entre os 4 – 8 kHz, visto terem a audição especializada para deteção de presas.

Os estudos de RATC foram realizados num número ainda limitado de espécies de aves, englobando principalmente pequenos não-passeriformes como o periquito australiano, entre outras aves canoras (Brittan-Powell et al., 2005). Estas aves, ao contrário das corujas (predadores noturnos) parecem possuir a audição especializada para interações sociais, correspondendo geralmente o espectro de audição mais sensível ao espectro de vocalização da espécie em questão.

Devido essencialmente à falta de integração temporal nas RATC (são necessários estímulos mais longos) e pelos números de fibras necessárias para incitar estas respostas, o audiograma de RATC revela-se em muitos estudos menos sensível que o audiograma comportamental, apesar de a sua forma ser semelhante. Em aves, a estimativa de limiares de sensibilidade auditiva com a RATC é em média cerca de 30 dB menos sensível (Brittan-Powell et al., 2002, 2005).

3.2.2. Resumo da técnica

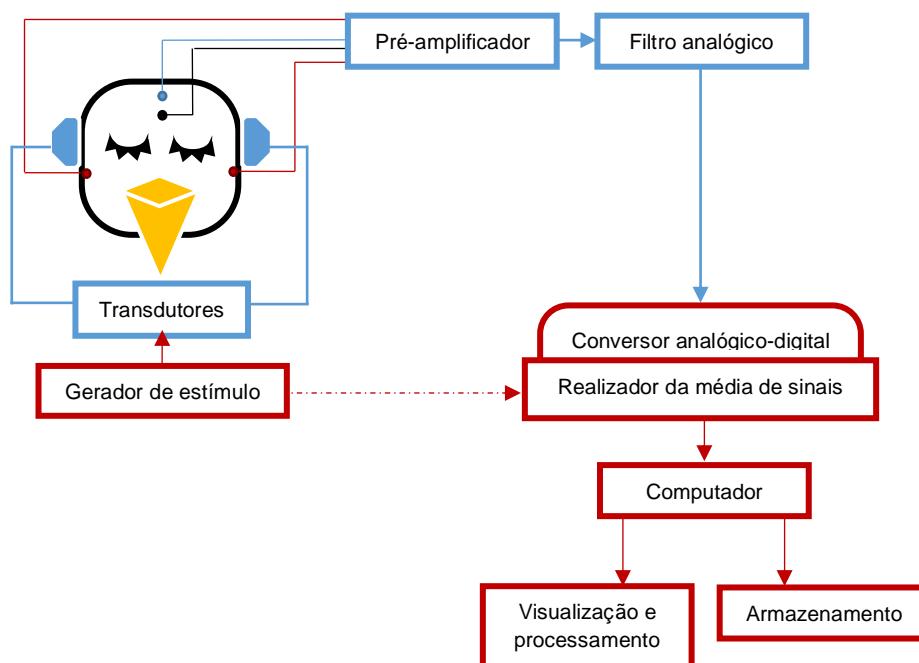
Os sinais sonoros, gerados pelo sistema de audiometria, são transmitidos por meio de transdutores. Regra geral em humanos estes são auriculares colocados nos ouvidos, ou vibradores ósseos colocados na cabeça. Em aves é mais comum a utilização de uma coluna

(Brittan-Powell et al., 2002; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2005; Brittan-Powell, Dooling, Ryals, & Gleich, 2010a; Noiro, Brittan-Powell, & Dooling, 2011b)

A resposta bioelétrica do ouvido e tronco cerebral, evocada pelo estímulo sonoro, é posteriormente detetada por elétrodos colocados em locais específicos da cabeça. (Hall, 2015) Após a deteção dá-se o início do processamento da atividade elétrica em bruto (EEG) para obter a RATC. Inicialmente esta passa por um pré-amplificador e filtros antes de ser convertida, pela placa de aquisição de dados, de sinal análogo a digital, possibilitando o seu registo e processamento através de um computador. Após a conversão, o sinal continuará a ser tratado com amplificadores, filtros digitais e outras ferramentas de eliminação de ruído elétrico. Na última fase do processamento será realizada a média de sinais para aumentar a definição das ondas. O início da média de sinais é desencadeado pela apresentação do estímulo (Esquema 1).

A resposta final será apresentada num ecrã de exibição sob a forma de um gráfico de ondas onde a latência (em milissegundos) e a amplitude (em microvolts), de cada pico, podem ser determinadas. Estas ondas eletrofisiológicas e os dados que delas advêm podem ser armazenados numa base de dados para posterior observação e interpretação. (Goldstein & M.Aldrich, 1999; Bess & Humes, 2009; Hall, 2015; Burkard & Don, 2015)

Esquema 1 – Esquema ilustrativo de um sistema de deteção de respostas evocadas auditivas (Original).



3.2.3. Preparação para o teste

Antes da realização do teste é importante uma recolha de dados do paciente que possam ter influência na resposta como a idade, sexo, historial médico, fármacos administrados anteriormente e temperatura. A preparação prévia do equipamento necessário também é importante, para que este esteja preparado e facilmente disponível no momento de realização do exame. O local onde irá decorrer o exame deverá ter o mínimo de interferência elétrica e sonora, assim como uma temperatura controlada.

A preparação do sistema de registo de potenciais evocados auditivos passa por conectar o pré-amplificador ao audiómetro que por sua vez deverá ser conectado ao computador já ligado e com software correspondente instalado. O audiómetro deverá também ser ligado ao transdutor (coluna ou auriculares) a ser utilizado para transmitir o estímulo. Os elétrodo por sua vez estão conectados a entradas específicas do pré-amplificador.

Para realizar este teste em aves é necessário recorrer a sedação ou anestesia como método de contenção, mas também para diminuição de ruído elétrico (por diminuição dos potenciais miogénicos) gerando respostas mais viáveis (Hall, 2015).

Na grande maioria dos testes em aves, tendo em conta que até à data são essencialmente canoras e rapinas noturnas, a sedação utilizada é quetamina em doses que variam entre os 25-50 mg/Kg em conjunto com diazepam a 2 mg/Kg. Esta sedação providencia geralmente uma imobilização de cerca de 75 minutos (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005, 2010a; Noirot et al., 2011b).

Apesar disto a utilização de anestesia inalatória com isoflurano tem-se mostrado uma opção mais viável para indução e manutenção da anestesia em aves, devido ao seu baixo custo, indução e recuperação rápidas e baixa solubilidade no sangue com mínimo metabolismo. A utilização de isoflurano diminui também a probabilidade de ocorrência de arritmias. A indução é feita com uma máscara e o animal deverá ser posteriormente entubado para manutenção da anestesia. (Edling, 2006) Crowell (2015) utilizou este tipo de anestesia para estudar as RATC em diferentes espécies de aves aquáticas.

As RATC não são alteradas significativamente pela anestesia e esta permite que mais dados possam ser recolhidos num menor período de tempo. Uma vez anestesiado, o animal é colocado em decúbito esternal com a cabeça ligeiramente elevada. Se forem utilizados auriculares estes são colocados em cima dos ouvidos com cuidado para não colapsar o canal auditivo externo. Se for utilizada uma coluna, esta é normalmente colocada entre 20 a 30 cm do ouvido a testar. Elétrodo subcutâneos são geralmente colocados no vértice da cabeça e em posição rostral à base de cada ouvido. Cada um dos elétrodo ao pé do ouvido serve de terra quando o contralateral está a ser utilizado como ativo. Após ligados ao pré-amplificador, a impedância dos elétrodo é testada para garantir que a diferença entre o ativo e referência não excede os 3 Kilo ohm e que nenhum deles excede os 10 Kilo ohm

(Scheifele & Clark, 2012). Feita esta preparação dá-se início à audiometria submetendo o animal aos estímulos teste predefinidos.

3.2.4. Parâmetros dos estímulos sonoros

A RATC é sensível a manipulações dos parâmetros do estímulo que desencadeia a resposta, incluindo a polaridade, se tem apresentação mono ou binaural (teste de um ouvido ou ambos em simultâneo), o espectro de frequências, intensidade, taxa de apresentação, presença de camuflagem sonora, o tempo de análise e o tipo de transdutores utilizados (Burkard & Don, 2015). É importante conhecer estes parâmetros e os efeitos da sua calibração para saber selecionar o sinal mais correto de modo a obter a resposta objetivo, com a maior viabilidade possível. Esta calibração tem de ser feita antes de dar início ao teste.

3.2.4.1. Duração

Há uma relação direta entre a duração da resposta e a duração do estímulo que a desencadeou. Respostas mais lentas (com maiores latências) são idealmente ativadas por estímulos de longa duração. Em contraste, respostas mais rápidas de curta latência, são idealmente registadas com estímulos de início e duração curtos (Hall, 2015). Portanto, estímulos sonoros transitórios ou de curta duração são os idealmente utilizados para deteção de RATC. Os estímulos de longa duração são mais utilizados em audiometrias comportamentais (Goldstein & M.Aldrich, 1999).

3.2.4.2. Tipos

Existem essencialmente dois tipos distintos de estímulos sonoros transitórios descritos, utilizados nesta técnica: o clique e o *tone burst*. Os cliques têm uma banda de frequência abrangente que resulta na estimulação da maior parte da cóclea e 0,1 ms é a duração mais comumente utilizada. Este estímulo é interessante para obter uma estimativa geral da sensibilidade auditiva, a várias frequências (Goldstein & M.Aldrich, 1999; Hall, 2015).

Para estimular uma região limitada da cóclea (isto é possível dada a sua organização tonotópica) recorremos a estímulos com um curto espectro de frequências como o *tone burst*. A duração mais utilizada para deteção de RATC em aves é 5 ms com intervalo entre estímulo de pelo menos 20 ms, ou seja, o *tone burst* é o estímulo mais utilizado. (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002; Brittan-Powell, Dooling, Ryals, & Gleich, 2010c; Brittan-Powell et al., 2005; Noirot et al., 2011b) Estes sinais, apesar de não serem puros, (constituídos por apenas uma frequência) apresentam a maioria da energia acústica

concentrada em apenas uma região de frequência. (Goldstein & M.Aldrich, 1999; Hall, 2015; Burkard & Don, 2015)

Estímulos de frequência específica são essenciais para testar o limiar de sensibilidade auditiva em função da frequência além de permitirem determinar qual a frequência de melhor audição (será a que apresenta o limiar mais baixo).(Brittan-Powell et al., 2002)

As frequências mais frequentemente testadas para determinação de limiares de sensibilidade auditiva em aves são: 500, 1000, 1500, 2000, 2860, 4000, 5700 e 8000 Hz. (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2010b, 2005; Noiroto et al., 2011b) Em estudos de limiares auditivos em corujas a frequência do sinal pode chegar aos 12 kHz. (Brittan-Powell et al., 2005)

3.2.4.3. Intensidade

O limiar da RATC ou limiar auditivo corresponde à intensidade mais baixa a que é desencadeada uma resposta detetável, para determinada frequência. Para estimar o limiar da RATC é necessário variar a intensidade do estímulo para saber a que nível é desencadeada a resposta para determinada frequência (Burkard & Don, 2015). Este é possivelmente o parâmetro com mais influência na resposta (Weerd, 1983; Bess & Humes, 2009).

Existem vários procedimentos aceitáveis para testar a resposta a diferentes frequências, mas o mais comumente utilizado para determinação de sensibilidade auditiva em aves é começar com intensidades mais baixas, passando progressivamente para mais altas, em intervalos variáveis. O mais comum em testes de sensibilidade auditiva em aves é serem utilizados intervalos de 5 a 10 dB e o máximo de intensidade testada é geralmente 100 dB SPL. (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2010c, 2005; Noiroto et al., 2011b)

Em todas as espécies estudadas até à data, com o aumento da intensidade do sinal sonoro, a latência das respostas tende a diminuir e a amplitude aumentar (Brittan-Powell & Dooling, 2004).

A unidade de medida da intensidade do som é o decibel, existindo várias referências para o descrever. A referência mais utilizada na descrição de intensidade das RATC em humanos é dB nHL (*normal hearing level*), na qual o 0 dB nHL representa o limiar auditivo comportamental estabelecido como normal, num grupo de indivíduos adultos sem perda auditiva, para determinado estímulo. Neste trabalho foi utilizada a referência de dB SPL (*sound pressure level*), de uso bastante comum nos estudos de ciência auditiva, em que 0 dB SPL representa 20 microPascals (Hall, 2015).

3.2.4.4. Taxa de apresentação

Os efeitos da taxa de apresentação do estímulo são produto da interação com os vários outros parâmetros do estímulo (Hall, 2015). Apesar da variação, regra geral com o aumento da taxa de apresentação a latência da resposta tende a aumentar e a amplitude dos picos diminui (Burkard & Don, 2015). Isto sucede provavelmente devido a fadiga ou adaptação dos neurónios (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2005). As taxas de apresentação mais comuns variam entre os 3 a 4 estímulos por segundo mas uma resposta pode ser incitada com uma taxa de apresentação de até 100 cliques/s num sistema auditivo de uma ave adulta (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2010b, 2005).

3.2.4.5. Polaridade

A polaridade de um estímulo acústico depende se o diafragma do transdutor se move na direção do tímpano ou na direção contrária, ao produzir um som. Um sinal elétrico positivo produz um movimento do diafragma do transdutor em direção a membrana timpânica, gerando um sinal acústico com uma pressão positiva (condensação). O contrário acontece com o movimento do diafragma na direção contrária; produz-se uma onda de pressão negativa (rarefação) que leva ao movimento do tímpano para fora. A rarefação parece ser mais eficaz para obtenção da resposta resultando em picos com latências menores e amplitudes maiores. Por sua vez a alternância entre estímulos de condensação e rarefação favorece a motricidade do tímpano e evita a sobrecarga mecânica do sistema de transmissão tímpano-ossículos (Hall, 2015; Burkard & Don, 2015).

3.2.4.6. Apresentação monoaural e binaural

O teste faz-se geralmente utilizando estimulação monoaural (a um ouvido de cada vez) para permitir a correta avaliação da capacidade auditiva de ambos os ouvidos separadamente. A audição binaural refere-se ao processamento de som pelos dois ouvidos e a sua avaliação, apesar de raramente utilizada, tem interesse essencialmente para estudar a localização de sons (Hall, 2015; Laumen, Ferber, Klump, & Tollin, 2016). A resposta a estímulos binaurais é maior que a estímulos monaurais. Apesar disto a soma d

as respostas monoaurais de cada ouvido resulta numa maior amplitude de algumas ondas. A diferença entre estas duas respostas é que dá indicação quanto à interação binaural do indivíduo testado (Burkard & Don, 2015).

3.2.4.7. Camuflagem sonora

Para estimular apenas um ouvido de cada vez pode ser necessário recorrer a camuflagem no ouvido contrário. Isto consiste em introduzir um ruído de camuflagem no ouvido não-testado para impedir que este seja estimulado pelo som introduzido no ouvido teste através das interações neurais cruzadas ao longo do tronco cerebral. Esta camuflagem refere-se à habilidade de um sinal acústico suplantar a presença de outro sinal acústico de forma a este não ser detetado (Bess & Humes, 2008). Esta técnica ajuda a garantir que os resultados são específicos para a capacidade auditiva específica de cada ouvido (Hall, 2015).

A camuflagem pode também ser utilizada em testes de sensibilidade auditiva para ter uma estimativa mais próxima da realidade das aves no seu habitat natural, em que existe sempre algum barulho de fundo (Noirot et al., 2011b). Normalmente é efetuada com ruído branco (sinal aleatório com igual intensidade e diferentes frequências) apresentado a uma intensidade de 30 dB superior ao ouvido teste (Scheifele & Clark, 2012).

3.2.4.8. Tempo de análise

O tempo de análise é o período de tempo, após apresentação de um estímulo, durante o qual são colhidos dados da resposta evocada auditiva. Assim, na medição de respostas auditivas, este tempo tem de ser longo o suficiente para compreender a resposta alvo do teste em questão (Hall, 2015). Apesar de regra geral a resposta surgir nos primeiros 10 a 15ms, o mais frequente em aves é fazer 25ms de tempo de análise para deteção de RATC para que as ondas representativas de cada resposta se situem aproximadamente a meio do tempo (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2010b, 2005; Noirot et al., 2011b).

3.2.4.9. Transdutores

O transdutor é por definição um aparelho que converte energia. Os que se utilizam na medição de respostas evocadas auditivas em aves convertem o sinal elétrico num sinal acústico, capaz de desencadear uma resposta. A coluna é o transdutor mais comumente utilizado em estudos de estimativa da sensibilidade auditiva em aves mas também podem ser utilizados auriculares. (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2010b, 2005; Noirot et al., 2011b)

3.2.5. Processamento do sinal recebido

Após a produção do estímulo e sua receção por parte do paciente, são também de extrema importância para a resposta final os parâmetros de aquisição do sinal resposta que gerem o

seu processamento, determinando como a resposta é adquirida e registrada. Os principais parâmetros de aquisição incluem o tipo de elétrodos e a sua localização, a amplificação da atividade registrada, as configurações para a sua filtragem e o número de repetições de estímulo que contribuem para o registro de uma resposta.

3.2.5.1. Elétrodos

A detecção das respostas aos estímulos está completamente dependente destes sensores. Estes podem apresentar-se em vários formatos e colocam-se o mais próximo possível do local onde é gerada a resposta. Cada elétron é seguido por um cabo que por sua vez termina numa ficha. As fichas de vários elétrodos ligam-se depois a um pré-amplificador e a informação que daí sai vai entrar no sistema de respostas evocadas.

A colocação dos elétrodos é um fator técnico muito importante na correta medição das respostas. Os principais pontos a ter em conta para a sua boa colocação são: consistência de colocação nos vários pacientes; colocação anatomicamente correta; impedância inter-elétrodos baixa (menor que 3 Kilo ohm e cada um não deve exceder os 10 Kilo ohm); fixação estável ao longo do teste; desconforto mínimo do paciente (Hall, 2015). É importante medir a impedância inter-elétrodos após aplicação para garantir que se encontra baixa e igual entre elétrodos. Valores altos aumentam a magnitude da frequência da linha elétrica (50Hz na Europa e 60Hz nos Estados Unidos da América), aumentando por consequência o ruído elétrico de fundo (Burkard & Don, 2015).

Antes da colocação dos elétrodos, é importante uma limpeza com desengorduramento da superfície cutânea e alguma abrasão, com álcool por exemplo, a fim de remover células mortas e óleos que podem afetar a condutividade (aumentam a impedância elétrica) (Colon, Visser, Weerd, & Zonneveldt, 1983; Burkard & Don, 2015).

As RATC são potenciais registados a longa distância visto que os elétrodos são colocados no escalpe, relativamente longe do local onde são gerados (cóclea e tronco cerebral) (Goldstein & M.Aldrich, 1999). Em aves são muito utilizados elétrodos subcutâneos de platina-irídio (Okanoya & Dooling, 1987; Brittan-Powell et al., 2002; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2005; Brittan-Powell, Dooling, Ryals, & Gleich, 2010c; Noirot, Brittan-Powell, & Dooling, 2011a; Lohr et al., 2013; Brewer et al., 2015).

É possível a utilização de outros metais mas este é o que apresenta melhor condutância. Estes são colocados debaixo da pele possibilitando o contacto com iões de fluido extracelular que facilitam a transferência do sinal elétrico dos tecidos para o elétron (Burkard & Don, 2015).

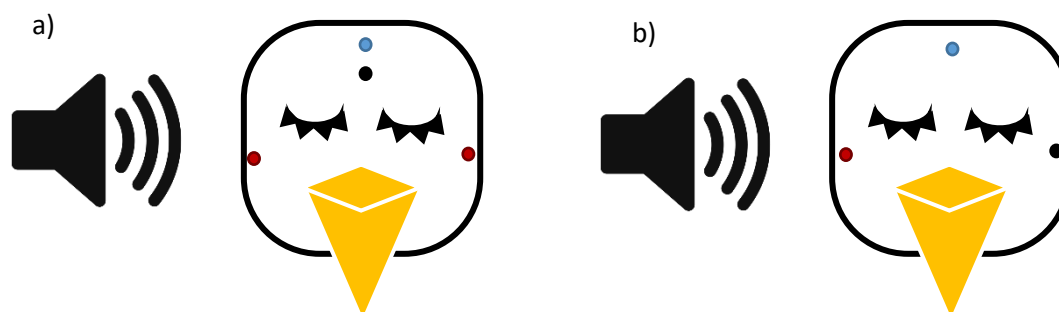
As categorias de elétrodos utilizados são o não-inversor (ativo; polo positivo), inversor (referência; polo negativo) e terra. São necessários pelo menos estes três elétrodos para formar um canal de registo (Goldstein & M.Aldrich, 1999; Burkard & Don, 2015).

3.2.5.1.1. Esquemas de posicionamento

Em RATC utilizam-se apenas três ou quatro elétrodos, consoante o registo seja feito com um ou dois canais, respetivamente. No registo com quatro elétrodos, os canais são denominados montagem ipsilateral (do lado estimulado) e contralateral (lado oposto ao estímulo). Neste caso o elétrodo não-inversor é colocado no vértice da cabeça, o elétrodo terra fica um pouco mais rostral em relação a este (pode ficar também na zona posterior do pescoço) e são utilizados dois elétrodos inversores colocados em posição caudal a cada um dos ouvidos (Figura 9-a); esta combinação é mais utilizada em humanos (Hall, 2015; Janssen, 2008).

No registo com três elétrodos, que é o mais comum em estudos de sensibilidade auditiva em aves, a diferença é que se utiliza apenas um elétrodo inversor, ficando o elétrodo terra no ouvido contrário (Figura 9-b) (Okanoya & Dooling, 1987; Brittan-Powell et al., 2002, 2010a, 2005; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Noirot et al., 2011a; Lohr et al., 2013; Brewer et al., 2015). Estes invertem com a troca do ouvido a estimular. Assim, neste registo existe apenas um canal de registo de cada vez (elétrodo inversor e não-inversor) enquanto no outro existem dois permitindo registar respostas dos dois ouvidos em simultâneo (Okanoya & Dooling, 1987; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005, 2010; Noirot et al., 2011; Lohr et al., 2013; Hall, 2015; Burkard & Don, 2015; Brewer et al., 2015).

Figura 9 – Esquemas do posicionamento de elétrodos para registo de RATC (Original).



Estímulo do ouvido direito com dois canais (A) e com um canal (B). Estão representados a azul os elétrodos não-inversores (+), a vermelho os inversores (-) e a preto os elétrodos terra.

3.2.5.2. Amplificação

Os potenciais bioelétricos variam entre dezenas de milivolts (mV) a menos de um microvolt (μV). Em aves, a amplitude de uma RATC pode variar entre os 1 e os 30 μV (Okanoya & Dooling, 1987; Brittan-Powell et al., 2002, 2010, 2005; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Noirot et al., 2011; Lohr et al., 2013; Hall, 2015; Burkard & Don, 2015; Brewer et al., 2015). Visto que os instrumentos eletrônicos em geral funcionam na escala dos volts, é necessário amplificar o sinal para que possa ser detetado e medido por um destes aparelhos.

Uma boa amplificação é importante para reduzir a necessidade de repetições de estímulo no processamento de médias de resposta (explicado em pormenor mais à frente). É importante quantificar esta amplificação de forma a posteriormente conseguir medir a voltagem real da resposta. Esta quantificação é efetuada com o conceito de ganho, definido como o rácio entre a voltagem de saída e a voltagem de entrada no aparelho amplificador. Os ganhos registados em estudos clínicos e experimentais variam entre os 10 000 e os 2 000 000. (Goldstein & M.Aldrich, 1999; Hall, 2015) Um registo de RATC em aves é geralmente amplificado com um ganho de cerca de 100 000. (Okanoya & Dooling, 1987; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005, 2010c; Noirot et al., 2011a ; Lohr et al., 2013; Brewer et al., 2015).

A amplificação é, regra geral, realizada em duas fases: primeiro pelo pré-amplificador (amplificação analógica) e posteriormente pelo sistema de deteção de respostas evocadas propriamente dito (amplificação digital) (Goldstein & M.Aldrich, 1999; Hall, 2015).

O pré-amplificador é o primeiro aparelho a processar a informação captada pelos elétrodos. Está conectado por um cabo ao aparelho principal de medição de respostas evocadas. A principal função deste aparelho é a amplificação diferencial do sinal elétrico, mas este pode também possuir funções de filtração do sinal e conversão do sinal análogo em digital, apesar destas funções serem normalmente concretizadas pelo sistema de deteção de respostas (Goldstein & M.Aldrich, 1999; Bidelman, 2015). A elevada impedância de entrada é uma característica importante deste aparelho para permitir a entrada sem distorção e evitar perda de amplitude do sinal (Goldstein & M.Aldrich, 1999).

Num pré-amplificador diferencial as voltagens dos elétrodos inversor e não-inversor são relativas ao eletrodo comum. Depois de invertida a voltagem do eletrodo inversor, a voltagem referente à combinação inversor – comum é subtraída da voltagem registada pela combinação não-inversor – comum (Burkard & Don, 2015). Com um correto posicionamento dos elétrodos, a atividade de fundo elétrica vai ser igualmente registada por ambos (ruído de modo comum), sendo a resposta auditiva captada de forma distinta consoante a proximidade do gerador da resposta. Como resultado o ruído de modo comum vai ser eliminado (rejeição de modo comum) e o sinal gerador da resposta não só permanece como

será amplificado. Esta função do pré-amplificador é denominada amplificação diferencial da resposta evocada auditiva (Hall, 2015; Burkard & Don, 2015).

A eficiência da rejeição de modo comum é expressa através do rácio da atividade elétrica de saída do amplificador com apenas uma das voltagens de entrada. Este denomina-se rácio de rejeição de modo comum, é expresso em decibéis e quantifica a capacidade do amplificador de rejeitar ruído de modo comum (Hall, 2015).

3.2.5.3. Filtração

A filtração é utilizada para eliminar atividade elétrica não relacionada com a resposta auditiva, melhorando a deteção do sinal de interesse. O principal objetivo é reduzir ou eliminar do processo de média de sinais a atividade elétrica não correspondente à resposta. Esta é feita inicialmente no pré-amplificador e posteriormente pode também ser realizada filtração digital no sistema de deteção de RATC (Hall, 2015).

É importante evitar filtragem excessiva porque pode ocorrer remoção de energia da resposta o que vai distorcer a latência dos componentes das ondas da resposta auditiva.

Existem essencialmente quatro tipos diferentes de filtro: de baixa-passagem, alta-passagem, passagem de banda e de rejeição de banda. O tipo mais usado em deteção de RACT é o de passagem de banda que permite a passagem de energia entre duas frequências de corte, reduzindo a energia acima e abaixo desta banda de frequências. A frequência de corte corresponde à frequência a partir da qual a voltagem de saída do filtro está reduzida a aproximadamente 70% da voltagem de entrada (ou diminuição de cerca de 3 dB). As frequências de corte mais comumente utilizadas para a deteção de RATC em aves são 30 Hz (passagem-alta) e 3 000 Hz (passagem-baixa) que corresponde à banda onde se encontra a maior parte da energia da resposta (Okanoya & Dooling, 1987; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005, 2010c; Noirot et al., 2011a; Lohr et al., 2013; Brewer et al., 2015). Alterações na banda de frequências através da qual a resposta é filtrada afetam a latência e amplitude do gráfico de ondas.

É também utilizado nestes estudos o filtro de rejeição de entalhe para eliminar o ruído da linha elétrica (varia com o local); na Europa corresponde aos 50 Hz, sendo esta a frequência a eliminar (Okanoya & Dooling, 1987; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005, 2010; Noirot et al., 2011; Lohr et al., 2013; Burkard & Don, 2015; Brewer et al., 2015). Apesar de usado com frequência nestes estudos, a utilização deste filtro não é recomendada visto que coincide com o espectro de frequência de RATC, removendo parte da energia da resposta (Janssen, 2008).

Os filtros mencionados anteriormente fazem parte do pré-amplificador, tratando-se de filtração analógica. A filtração digital, realizada pelo sistema propriamente dito, melhora a deteção da resposta sem a distorção de latência associada à filtração analógica. Esta é

realizada após a realização da média de sinais e rejeição de artefactos (Weerd, 1983; Hall, 2015).

3.2.5.4. Conversão analógico-digital

O sistema de detecção de respostas é um microprocessador digital. Assim para continuar o processamento, a informação análoga do pré-amplificador deve ser transformada em informação digital antes de poder entrar no sistema, através de um processo denominado conversão analógico-digital (Burkard & Don, 2015). Existem essencialmente dois problemas associados a este processo: a falta de memória do computador para armazenar todos os valores de voltagem de um sinal analógico contínuo e o facto de o processamento no computador ser feito com números digitais e não com aritmética.

O primeiro problema é resolvido com a amostragem dos valores de voltagem. O que significa que a informação da voltagem da resposta vai ser simplificada a uma sequência de amostras da voltagem em vários pontos igualmente espaçados no tempo (Goldstein & M.Aldrich, 1999). Este processo vai resultar num arredondamento das amplitudes da resposta com o qual perdemos informação, mas ganhamos a versatilidade de processamento de um computador.

A solução para o segundo problema consiste basicamente em fazer uma representação digital de cada amostra e é resolvido através de um processo chamado quantização. Este consiste em converter um espectro de valores contínuos num espectro finito de valores discretos (Goldstein & M.Aldrich, 1999).

3.2.5.5. Rejeição de artefactos

A rejeição de artefactos tem a função de reduzir o restante ruído que não foi eliminado pelo processamento anterior. Cada registo digitalizado, antes de ser encaminhado para a média de sinais, é examinado para a detecção de voltagens que ultrapassem um valor pré-determinado. Se todas as voltagens, de determinado registo, estiverem a este nível ou abaixo, serão armazenadas na memória do computador para realização de média de sinais juntamente com os restantes registos aprovados. Se, pelo contrário, for encontrada em alguma amostra uma voltagem que supera o valor pré-definido, esse registo será eliminado. Este processo previne que a resposta final seja dominada e distorcida por ruído de elevada amplitude (Goldstein & M.Aldrich, 1999).

Existem algumas limitações associadas à rejeição de artefactos como o atraso no progresso da média de sinais, a possibilidade de contaminação apesar do uso da técnica e o facto de muitos, senão todos, os registos eliminados possuírem uma resposta auditiva, ou seja há um descartar de informação importante com o descartar dos artefactos. Rejeição de

artefactos automática é uma função standard em sistemas de respostas evocadas (Hall, 2015).

3.2.5.6. Média de sinais

O rácio de sinal para o ruído de fundo (RSR) é um conceito essencial para entender a média de sinais, que se trata provavelmente do processamento mais importante para a obtenção de respostas evocadas auditivas viáveis. Este rácio consiste na relação matemática que descreve como é aumentada a resposta e reduzido o ruído durante a realização da média de sinais. Regra geral quanto maior o rácio, mais nítida a resposta evocada auditiva. Este rácio varia com a média de sinais (número de varreduras) segundo a seguinte equação:

Equação 1 – Rácio de sinal para ruído de fundo.

$$RSR = \frac{\textit{Amplitude do sinal} \times \textit{Número de varreduras}}{\textit{Amplitude do barulho}}$$

O número de varreduras corresponde ao número de repetições de estímulo que contribuem para o registo de apenas uma resposta. A amplitude do ruído é um fator crítico na determinação do número de varreduras necessárias para medição da resposta. Reduzir a amplitude do ruído de fundo é a forma mais eficaz de aumentar o rácio do sinal para ruído. Após todos os processos anteriores, na maior parte dos casos a resposta auditiva de interesse continua a ser menor que a atividade elétrica de fundo. Isto significa que o rácio sinal para ruído é baixo. Para aumentar este rácio e tornar consequentemente a resposta mais visível, aplicamos a técnica de média de sinais. Este processo pode ser considerado o mais determinante na medição de respostas evocadas auditivas. Visto que a medição de RATC só se tornou possível após a aplicação desta técnica (Hall, 2015).

No âmbito deste processamento é apresentado o mesmo estímulo repetidamente e é feito o somatório das voltagens da sua resposta. Posteriormente é realizada a média de sinais, dividindo o resultado do somatório pelo número de estímulos apresentados (Burkard & Don, 2015). O resultado desejado será que a resposta evocada auditiva permaneça igual ou algo amplificada, visto que está bloqueada temporalmente pelo início do estímulo, o que significa que cada componente da resposta surge mais ou menos no mesmo intervalo de tempo. Além disso o ruído elétrico de fundo idealmente vai-se também anulando, visto que ocorre a amplitudes e polaridades aleatórias.

Poderão surgir problemas caso existam fontes de ruído com frequências semelhantes à taxa de apresentação do estímulo, não sendo possível distinguir o ruído do estímulo. Pode

também acontecer que o ruído tenha uma apresentação regular, não sendo neste caso anulado pela média de sinais (Weerd, 1983; Hall, 2015).

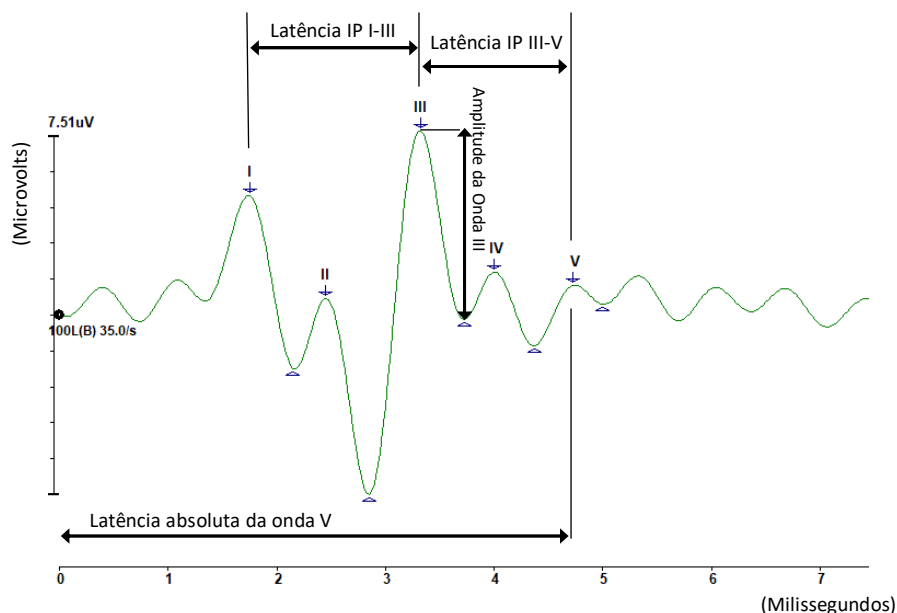
O número de apresentações de estímulo necessárias para obter uma resposta depende da amplitude da resposta, da amplitude do ruído de fundo e com o RSR objetivo. Um baixo número de varreduras pode levar à não detecção da resposta assim como uma realização de média excessiva pode levar a contaminação da resposta com ruído que não tenha sido eliminado (Burkard & Don, 2015). A altura ideal para parar é, regra geral, quando: a latência da resposta de interesse está na região esperada (tendo em conta o tipo e intensidade do estímulo e idade do animal); a aparência do gráfico da resposta é replicável ou muito parecida em duas respostas separadas após terem sido sujeitas a médias de sinais; a resposta de interesse é três vezes maior que qualquer pico de ruído que surja no tempo de análise (RSB 3:1) (Hall, 2015). Apesar do número de repetições recomendado em humanos ser 2000 (Burkard & Don, 2015), em estudos com aves geralmente utilizam-se entre 300 a 1500 (Okanoya & Dooling, 1987; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005, 2010; Noirot et al., 2011; Lohr et al., 2013; Brewer et al., 2015).

4. Resultados da medição e a sua análise

4.1. Gráficos de onda

O resultado deste teste apresenta-se sob a forma de uma série de ondas que constituem um gráfico, representando cada uma a progressão por um local diferente do caminho nervoso auditivo. Estas surgem regra geral num domínio temporal com a amplitude apresentada em microvolts em função do tempo em milissegundos. Em humanos, admite-se que uma resposta é constituída por cinco componentes principais. Estes são comumente identificados com numeração romana como as ondas I, II, III, IV e V (Gráfico 3) (Hall, 2015). Esta classificação estende-se também aos estudos efetuados em aves.

Gráfico 3 – Gráfico de RATC da Águia-real utilizada no presente estudo (Original).



Frequência de teste de 2 kHz, intensidade de 100 dB e taxa de apresentação de estímulo de 35 estímulos por segundo. É visível a indicação de algumas das medidas mais relevantes a retirar para avaliar a RATC, nomeadamente as latências inter-picos (IP) I-III, III-V e de I-V, latência absoluta da onda V e amplitude da onda III.

Estas ondas representam a ativação de um número de fibras nervosas suficiente para desencadear uma resposta passível de ser registada, em locais sucessivos do caminho nervoso auditivo (Boston & Møller, 1985).

Em aves registam-se gráficos de ondas com quatro a seis picos positivos proeminentes que surgem nos primeiros 10 ms após o início do estímulo, de forma semelhante ao que acontece em mamíferos, e apresentam amplitudes que podem variar entre 1 a 30 μ V (Brown-Borg, Beck, & Jones, 1986; Jones, Beck, Brown-Borg, & Burger, 1987). Na maior parte dos estudos em aves, tem-se verificado que destes picos existem geralmente três dominantes que surgem nos primeiros 5 ms e cujas amplitudes variam entre os 2 e 10 μ V (Jones et al., 1987; Brittan-Powell et al., 2002).

4.2. Origem anatómica das ondas

Apesar da semelhança na morfologia das respostas, os locais de origem das diferentes ondas não coincidem na totalidade entre humanos e outras espécies devido essencialmente à redução no tamanho ou desaparecimento de alguns núcleos ou grupos de células e em parte ao maior comprimento do VIII nervo craniano (Møller & Jannetta, 1985; Moore, 1987).

Os resultados de experiências em pequenos mamíferos (gatos, murganhos e porquinhos da índia) indicam que as principais origens anatômicas dos quatro primeiros picos estão localizadas em neurónios, ou regiões próximas, das seguintes estruturas: porção coclear do VIII nervo craniano (pico I); núcleo coclear (pico II), núcleo olivar superior (pico III), núcleo ventral do leminísco lateral (pico IV) e colículo inferior (pico V). Apesar da existência de diferenças anatômicas entre os mamíferos estudados e aves, parte-se do princípio que a base das origens anatômicas das ondas é semelhante em ambas as classes (com a diferença de que nas aves o pico V corresponde ao MLD, homólogo do colículo inferior nos mamíferos) (Brown-Borg et al., 1986).

Contudo, os estudos realizados nesta área não são ainda suficientes para inferir com certeza a origem anatômica exata das ondas de RATC neste grupo de vertebrados. Existem fortes evidências de que a onda I na resposta em aves corresponde, tal como em mamíferos, ao VIII nervo craniano, o nervo auditivo (Brown-Borg et al., 1986; Brittan-Powell et al., 2002; Lucas, Freeberg, Krishnan, & Long, 2002). As evidências da origem das restantes ondas são mais incertas. Seriam necessários estudos de lesões nas diferentes espécies de aves para determinar com mais precisão os desencadeadores destas partes da resposta.

Existe também o problema de se tratar de uma classe muito variada de animais e de terem sido efetuados estudos de RATC apenas a um pequeno número de espécies. Nestes estudos já se detetou alguma variabilidade inter-espécies. Um estudo efectuado em passeriformes mostrou que a onda II poderá ser a porção proximal do nervo auditivo ou poderá ser originada no núcleo magnocellular (J. R. Lucas et al., 2002). Por outro lado, estudos realizados em psitacídeos sugeriram que a onda II pode corresponder ao núcleo laminar, com base em semelhanças de latência da onda noutros estudos, enquanto em corujas este núcleo pode ser manifestado na onda III (Brittan-Powell et al., 2002, 2005).

4.3. Avaliar presença de resposta

Para ser considerada presente ou ausente, uma resposta tem de ser replicável, ou seja, a presença de uma onda tem de ser repetível, em toda a sua duração. Por outro lado, a decisão de que uma onda está ausente, só pode ser tomada quando as replicações são essencialmente planas e com pouca diferença entre elas. Se o pico da onda em questão não for replicável ou se as replicações não forem planas significa que são necessárias mais replicações (Stapells, 2000).

Para avaliar a repetibilidade das ondas são comparados dois ou mais gráficos de onda repetidos, sob as mesmas condições (igual estímulo e parâmetros de aquisição). O conceito base é que esses dois ou mais gráficos, após a média de sinais, quando sobrepostos sejam muito semelhantes. Isto é feito por deteção visual, que torna o método subjetivo, podendo variar consoante o operador.

Apesar da subjetividade inerente, existem critérios que permitem padronizar a identificação de resposta no traçado. Para admitir a presença de uma resposta clara tem de existir um elevado grau de correlação entre repetições e as ondas devem apresentar as características esperadas em termos de amplitude, latência e morfologia. A amplitude da resposta deverá ter um mínimo de 40nV e pelo menos três vezes maior que o ruído de fundo (Stevens, Booth, Brennan, Feirn, & Meredith, 2013). A latência das ondas apresenta pouca variação entre indivíduos, podendo ser considerada uma boa característica para identificação de RATC (Brittan-Powell et al., 2002). Morfologia é o padrão geral ou aparência normal esperada da resposta num gráfico de ondas e é considerada um critério subjetivo. As latências inter-picos também podem ajudar a averiguar se uma resposta é viável. Se o for, não deverá exceder os 0,8 ms entre I-III, III-V e I-V (Hall, 2015).

É importante também que as ondas sejam comparadas entre respostas a estímulos de diferentes intensidades para confirmar que estas seguem as alterações de esperar com a alteração da intensidade do estímulo (Stevens et al., 2013).

4.4. Latência e amplitude dos componentes da resposta em aves

A amplitude dos picos está positivamente relacionada com o número de fibras nervosas auditivas que respondem ao estímulo apresentado e indicam a força da resposta do gerador em questão e a latência está relacionada com o tempo médio de reação das fibras nervosas auditivas. A amplitude é representada no gráfico de ondas no eixo vertical e descrita em microvolts. Esta característica de uma onda é comumente desde o pico da onda até ao vale subsequente (Figura 11). A latência por sua vez é representada no eixo horizontal, descrita em milissegundos e medida desde o início do estímulo sonoro até ao pico da onda em questão (Figura 11) (Lucas et al., 2002; K. S. Henry & Lucas, 2009; Hall, 2015).

Diferentes ondas possuem diferentes amplitudes, por exemplo, tendencialmente em mamíferos a onda V apresenta a maior amplitude. Em aves, vários estudos identificam a onda I como a onda do registo com maior amplitude (Lucas et al., 2002; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005). Os valores de amplitude variam bastante de acordo com o teste, seus parâmetros e com o animal em questão. Em aves os valores mais frequentemente registados até à data encontram-se entre os 0 e 20 μ V.

A latência, tal como a amplitude, varia consoante as características do estímulo. No entanto, existe pouca variação entre indivíduos da mesma espécie. Em aves a onda I normalmente encontra-se aproximadamente entre os 1.5ms a 2.5ms, a onda II entre os 2 a 3ms e a onda III aproximadamente entre os 2.5 e os 3.5 (Brittan-Powell et al., 2002; Lucas et al., 2002; Gall, Brierley, & Lucas, 2011).

A amplitude e latência, tal como os limiares auditivos, podem ser utilizadas como medidas de sensibilidade auditiva. Regra geral, a amplitude da resposta aumenta com o aumento da

intensidade do estímulo, acima do limiar auditivo, assim como a latência diminui. Comparando RATC registadas com o mesmo nível de intensidade, a amplitude é diretamente proporcional à sensibilidade auditiva e a latência é inversamente proporcional. A latência tende a ser mais reduzida nas frequências de maior sensibilidade auditiva, aumentando acima ou abaixo destas (Gall et al., 2011). É observado um aumento de latência a altas frequências que não se observa em mamíferos. Isto pode refletir uma diferença na afinação dos filtros auditivos periféricos dentro da cóclea, podendo também estar relacionado com o facto de possuírem apenas um ossículo no ouvido médio (em comparação com mamíferos que possuem três) (Brittan-Powell et al., 2002; Kenneth S. Henry & Lucas, 2008).

4.5. Latências inter-picos

A latência inter-picos pode ser medida para qualquer par de ondas, mas as medidas mais utilizadas são dos pares I-III, e I-V. A latência inter-picos do primeiro par, I-III, representa aproximadamente o tempo necessário para a atividade criada no nervo auditivo chegar à ponte. A latência de I-V é uma medida aproximada do tempo desde o potencial de ação do nervo coclear até ao mesencéfalo, esta medida também é denominada tempo de condução central ou tempo de transmissão do tronco cerebral. O intervalo entre as ondas I-V poderá ser aumentado como resultado de lesões que envolvam o nervo auditivo e o tronco cerebral e é um indicador viável de défices retrococleares.

Em humanos, assim como se verificou na maioria dos estudos em aves, as latências inter-picos não são afetadas por uma diminuição da intensidade do estímulo aplicado ou por alterações de estruturas periféricas (Brittan-Powell et al., 2002, 2005; Scheifele & Clark, 2012; Lohr et al., 2013). Na maioria dos estudos em aves até à data são encontradas apenas as ondas I, II e III, só sendo possível determinar e avaliar o valor da latência do intervalo I-III ou por vezes apenas I-II (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Vidler & Parker, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005; Ramsier & Dominy, 2010; Gall et al., 2011). Regra geral este intervalo não varia com variações de intensidade mas sim com variações da taxa de apresentação do estímulo (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005).

4.6. Determinação de limiares

O limiar auditivo de RATC corresponde à intensidade de estímulo mais baixa capaz de desencadear uma resposta detetável (Kenneth S. Henry & Lucas, 2008). A deteção de limiares auditivos é um componente muito importante da análise de RATC pois são essenciais à realização do audiograma (resultado final de uma audiometria). Apesar disto, não existe um critério objetivo acordado entre profissionais para a sua determinação e

interpretação (Vidler & Parker, 2004). O método mais comumente utilizado de detecção de limiares auditivos de RATC é a detecção visual (Ramsier & Dominy, 2010; Hill, 2011).

O critério definido pela Newborn Hearing Screening Program (NHSP), para identificação visual do limiar consiste na reunião das seguintes condições: ausência de resposta a 5 ou 10 dB abaixo deste limite e presença de resposta clara também 5 ou 10 dB acima deste limite, em registos obtidos sob boas condições (Stevens et al., 2013). Em aves é comum, em estudos realizados no passado, definir os limiares como a intensidade 2.5 dB abaixo do estímulo mais baixo a partir do qual a resposta pode ser visualmente detetada no registo (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005). Apesar da desvantagem de possuir um carácter subjetivo, este método é o que resulta em limiares mais próximos dos limiares auditivos comportamentais. (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Vidler & Parker, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005; Ramsier & Dominy, 2010; Gall et al., 2011)

Além da detecção visual, existem outros métodos de detecção de limiares, também usados em estudos em aves, como o método do critério e métodos que envolvem processamento estatístico como os métodos de regressão linear, de correlação cruzada e de F^* mas nenhum deles apresenta melhores resultados que a detecção visual (Ramsier & Dominy, 2010).

Os limiares são mais baixos no intervalo de maior sensibilidade auditiva, no caso da maioria das aves entre os 2 a 3 kHz, sendo maiores a frequências acima e abaixo da zona de maior sensibilidade (R. J. Dooling et al., 2000; Brittan-Powell et al., 2002).

4.7. Audiograma

A principal ferramenta para descrever e comparar a audição de diferentes animais é o audiograma, visto ser a representação visual da capacidade auditiva média de uma espécie (Lohr et al., 2013; Martin, 2017). É uma representação gráfica da relação entre a frequência de um sinal e a intensidade mínima necessária para este ser audível (limiar auditivo), pela espécie testada (Gráfico 4).

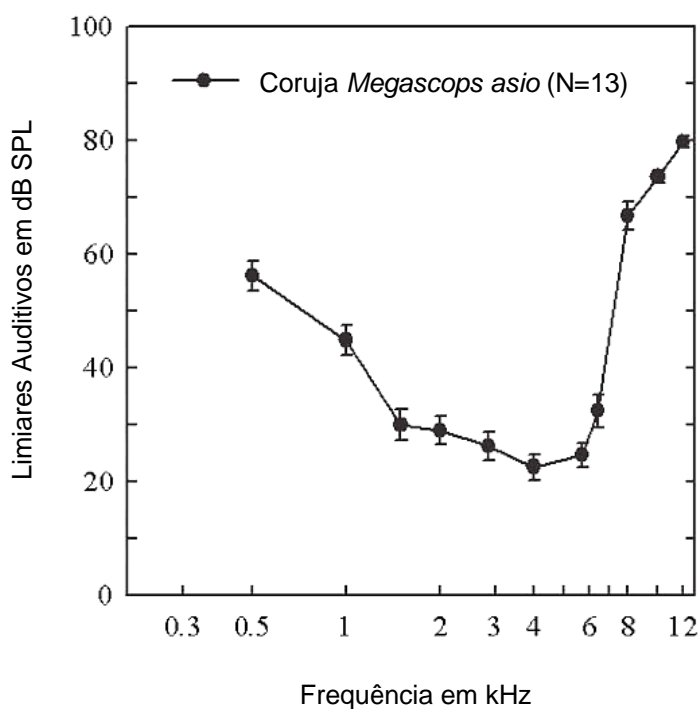
Este possibilita a visualização de dados importantes como o espectro auditivo do animal testado, a intensidade mínima necessária para detetar um som a determinada frequência e o seu intervalo de maior sensibilidade auditiva (Dobie & Van Hemel, 2005; R. Dooling, 2002; Martin, 2017). Um audiograma é apresentado com a frequência do sinal em hertz no eixo horizontal (x) e com a intensidade ou nível do sinal em decibéis no eixo vertical (y) (Bess & Humes, 2008).

O audiograma típico obtido em aves e na maior parte dos outros animais testados é caracterizado pela sua forma de U (Gráfico 4), independentemente do método audiométrico utilizado (eletrofisiológico ou comportamental) ou do método utilizado para os determinar os limiares (Crowell et al., 2015). Apesar disto os limiares auditivos de RATC tendem a ser 25 a

30 dB mais altos que os típicos limiares comportamentais. Isto sucede, pelo menos em parte, porque as respostas transientes por definição excluem a integração temporal do sinal sonoro (limiar temporal para deteção de um som) (R. J. Dooling, Lohr, et al., 2000; Gall et al., 2011).

Assim o audiograma resultante de RATC não é bom predictor de sensibilidade auditiva absoluta, apesar de ser a melhor opção para estimativa de sensibilidade em casos em que não é viável a realização de uma audiometria comportamental (Lohr et al., 2013). É também um teste viável para determinar a zona de maior sensibilidade auditiva. Na maioria das aves testadas a zona de maior sensibilidade, detetada no audiograma de RATC (entre os 1000 e os 4000 Hz), corresponde à zona de maior sensibilidade detetada num audiograma comportamental (Brittan-Powell et al., 2002; Crowell et al., 2015).

Gráfico 4 –Audiograma de RATC de coruja *Megascops asio* (Adaptado de Brittan-Powell et al., 2005).



A média foi efetuada com base em dados de 13 exemplares (média \pm SE). A partir deste audiograma conseguimos determinar a frequência e intensidade de melhor audição e os limites máximo e mínimo de frequência audível (espectro auditivo) médio dos animais testados.

4.8. Alterações mais frequentes e o seu significado

As cinco primeiras ondas surgem dos respetivos geradores nervosos que se encontram entre o gânglio coclear e o núcleo mesencefálico lateral pars dorsal (MLD). Qualquer anomalia das ondas pode ser devida a alterações em qualquer local, entre estes núcleos (Struppler & Weindl, 1985).

Genericamente, uma RATC poderá ser considerada anormal quando há: aumento da latência absoluta de uma ou mais ondas; prolongamento anormal de latência inter-picos; ausência de ondas; uma diferença significativa entre a RATC dos dois ouvidos (Colon et al., 1983; Tandon, 1998).

O critério mais importante utilizado para deteção de anomalias de RATC é o prolongamento dos intervalos inter-picos para lá de 99% do limite de tolerância (que corresponde à média mais três vezes o desvio padrão). Este prolongamento anormal geralmente reflete uma alteração patológica na condução auditiva central (Tandon, 1998).

Alterações nas RATC podem variar bastante, dependendo da sua origem. Em caso de disfunção audiológica periférica, as latências da onda I e todas as ondas sucessivas aumentam de igual modo, não existindo alteração significativa dos intervalos inter-picos. A curva do audiograma desloca-se para a direita, mantendo a mesma estrutura. Patologia auditiva grave pode resultar no desaparecimento de todas as ondas.

Em disfunções neurológicas a latência da onda I pode variar, mas a sua presença aponta para alguma função no aparelho auditivo. Qualquer patologia que provoque dificuldade na passagem do sinal pelo caminho auditivo vai provocar um aumento do intervalo inter-picos. Isto vai refletir-se no audiograma tornando a curva mais aberta e prolongada. Em lesões neurológicas mais graves uma ou mais ondas podem desaparecer por completo (Tabela 1) (Colon et al., 1983).

Tabela 1 – Anomalias de RATC e os significados prováveis (Adaptada de Linical & Rimer, 2007).

Alteração da RATC	Significado
Latência da onda I prolongada	Lesão na porção distal do VIII nervo craniano
Latência inter-pico I-III prolongada	Lesão entre a porção proximal do VIII nervo craniano e a ponte
Latência inter-pico III-V prolongada	Lesão entre a porção rostral da ponte e o mesencéfalo
Latência de I-III e III-V prolongadas	Alteração de vários núcleos
Onda I ausente com ondas III e V normais	Perda auditiva periférica moderada
Onda III ausente com ondas I e V normais	Variação normal (não patológica)
Onda V ausente com ondas I e III normais	Lesão acima da ponte caudal
Ausência de todas as ondas	Perda auditiva grave
Ausência de todas as ondas excepto a I	Morte cerebral

Na presença de morte cerebral (mais especificamente morte do tronco cerebral) todas as ondas desaparecem, persistindo apenas, por vezes, a onda I. Em caso de surdez bilateral há o desaparecimento total de todas as ondas (Colon et al., 1983; Struppler & Weindl, 1985).

As RATC não são significativamente afetadas por alterações metabólicas ou por fármacos. No entanto estas são influenciadas pela temperatura, tendo esta particular importância em pacientes inconscientes (Struppler & Weindl, 1985; Tandon, 1998).

Enfartes, tumores e lesões necróticas do tronco cerebral provocam frequentemente anomalias de RATC e a correlação destas alterações com as lesões tem contribuído para o nosso conhecimento do local onde surge cada onda (Struppler & Weindl, 1985).

Intoxicações com repercussões nervosas ou administração de substâncias ototóxicas também poderão provocar alterações nas RATC. Já foi comprovado que intoxicação com

metil-mercúrio em Mandarins provoca aumento dos limiares auditivos o que se traduz numa diminuição da sensibilidade auditiva (Wolf, Swaddle, Cristol, & Buchser, 2017). Foi também demonstrado que a administração de aminoglicosídeos em manons (*Lunchura striata domestica*) resultou num aumento dos limiares auditivos (aumento de 24 a 43 dB, acima dos 2 kHz) (Woolley, Wissman, & Rubel, 2001).

Apesar de não existirem ainda estudos que o comprovem, é provável que outras causas (p.e. traumáticas ou infecciosas) resultem em alterações de RATC. Em teoria, qualquer patologia que provoque alteração da condução nervosa ou que afete o aparelho auditivo periférico poderá provocar a alteração desta resposta.

5. Aplicações da técnica em aves

5.1. Em investigação

O estudo de RATC abre portas para outras investigações como recuperação de audição após regeneração celular (as aves, ao contrário dos mamíferos, possuem capacidade de regeneração de células ciliadas), resposta de fase da papila basilar e o desenvolvimento da audição, sendo particularmente interessante para este último pelo facto de se tratar de uma técnica não invasiva, permitindo testes repetidos do mesmo indivíduo (Woolley et al., 2001; Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2010a). Existe interesse em continuar a realização destes testes noutras espécies de aves, por vários motivos: para determinar se este teste é viável na estimativa de limiares de sensibilidade auditiva para a espécie em questão; para realizar comparações entre espécies; para averiguar se existe paralelo entre a sensibilidade auditiva e a sua capacidade vocal da ave ou a capacidade vocal das suas presas entre outras variáveis como o sexo ou idade da ave (Brittan-Powell et al., 2005).

5.2. Em clínica veterinária

A deteção de RATC tem especial interesse em diagnóstico de patologia auditiva e neurológica em veterinária por ser um teste que não é afetado pelo estado de consciência, permitindo sedação ou anestesia do paciente sem alteração da resposta. Esta técnica permite a distinção entre perda auditiva sensorial ou condutiva e tem sido também usada para avaliar sensibilidade auditiva. As RATC têm sido vastamente utilizadas em medicina humana na ajuda ao diagnóstico de doenças neurológicas, disfunção auditiva em adultos e crianças, na medição de maturação do SNC, monitorização intraoperatória, monitorização de tratamentos de doenças do SNC. Estes procedimentos de diagnóstico, extensamente utilizados em seres humanos, são cada vez mais foco de atenção na área da medicina veterinária e investigação animal (Tandon, 1998; Scheifele & Clark, 2012).

5.3. Em medicina de conservação

Em centros de recuperação pode ser interessante a utilização desta técnica para avaliar as condições neurológicas e auditivas de uma ave antes da sua libertação, podendo aumentar as suas hipóteses de sucesso.

Além disto, o estudo de sensibilidade auditiva poderá ter também ter interesse ecológico, não só pela sua potencial aplicação em medicina de silvestres e selvagens mas também na medida em que os dados acerca da sensibilidade auditiva das diferentes espécies podem ser utilizados como ferramenta para manter as aves afastadas de estruturas potencialmente fatais como aeroportos, cabos de alta tensão ou ventoinhas eólicas através da utilização de sons dentro da frequência de maior sensibilidade da espécie alvo (R. Dooling, 2002). Existem já aparelhos de semelhante natureza, nomeadamente emissores de infrassons para afastar pombos ou dissuasores de aves que emitem sons de aves predadoras.

Objetivos

Os principais objetivos deste trabalho são a descrição e aplicação prática da técnica de deteção de RATC em aves, adaptando-a às três espécies de aves de rapinas diurnas, testadas a título de exemplo. Isto terá o propósito final de obter uma estimativa da sensibilidade auditiva destas três aves e verificar como se comparam entre si e com os resultados de outras espécies já estudadas. Também se procurou avaliar a viabilidade deste protocolo nestas espécies de aves.

Materiais e Métodos

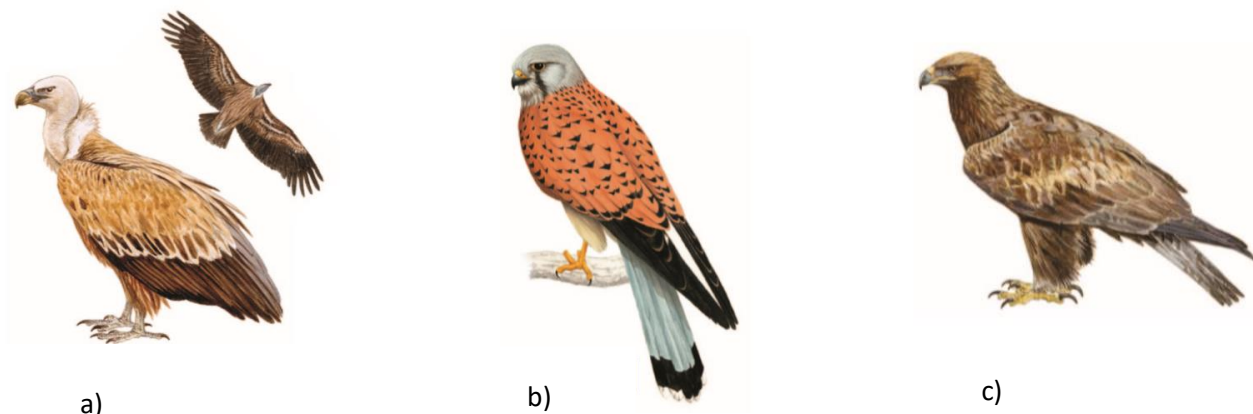
6. Animais utilizados

Entre os meses de Janeiro a Abril de 2017 foram utilizados animais com estatuto de irrecuperáveis mantidos no departamento de educação ambiental do GREFA- Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat. Só foram escolhidos animais com historial sem antecedentes de problemas auditivos e sem fatores que pudessem complicar a anestesia, tais como patologia cardíaca ou respiratória.

Tabela 2 – Alguns dos dados recolhidos para cada ave (original).

Espécie	<i>Gyps fulvus</i>	<i>Falco tinnunculus</i>	<i>Aquila chrysaetos</i>
Data do teste	17/10/17	10/01/17	28/02/17
Identificação IHS	4032-2017AH01	4032-2017A01	4032-20172S02
Nº Historial	12/0051	12/3247	10/0171
Nº Anilha	H0403	K0048	H0725
Peso (g)	8300	216	3860
Condição corporal	4	3	3,5

Figura 10 – Ilustrações científicas representativas de cada espécie testada (Adaptado de Assírio & Alvim, 2012).



a) *Gyps fulvus* b) *Falco tinnunculus* c) *Aquila chrysaetos*

7. Equipamento de audiometria

Para apresentação do estímulo, aquisição da resposta, controlo do equipamento e gestão de dados foi utilizado o equipamento da *Intelligent Hearing Systems*® (IHS) conectado a um portátil com o software IHS *SmartEP* V.4.22.. O material que este sistema engloba inclui um par de auriculares de inserção ER3C adaptados com uma pequena cúpula de plástico (1 cm²) ou uns auriculares Etymotic ER3a no caso de *Gyps fulvus* (figura 11 a), ligados à *Smart box* universal que se encontra conectada ao computador. É composto também por quatro elétrodos subcutâneos de aço inoxidável de 13 mm de comprimento e 0,4 mm de diâmetro da *Technomed Europe*® conectados a um pré-amplificador *Opti-amp 8002*® que por sua vez se encontra ligado à *Smart box*. Foi também utilizado um condicionador de energia *PowerVar*®.

8. Protocolo e restantes materiais

8.1. Preparação do teste

No dia do teste a sala a utilizar foi previamente aquecida com um termoventilador e todos os equipamentos eletrónicos, que não fossem necessários à sua realização, eram desligados. Para a anestesia foram verificados o circuito e o nível de isoflorano, dispostos os materiais necessários à monitorização da anestesia, anamnese (medidor de crânio, balança, doppler, sonda esofágica para medição da temperatura) e preparados os fármacos de urgência (Doxapram, Epinefrina e Atropina). Posteriormente foi também preparado o equipamento da audiometria propriamente dita: a *Smart Box* universal foi conectada ao computador e o pré-

amplificador por sua vez conectado à *Smart Box*, foi ligado o condicionador energético *PowerVar* e iniciado o software *SmartEP* (*Smart Evoked Potentials*) da IHS no computador.

8.2. Preparação do animal

Antes da realização da audiometria as aves foram sujeitas a 24h de jejum. Na altura da realização do teste, depois da sala e materiais preparados, os animais foram capturados nas respetivas jaulas, com uma rede no caso da Águia-real ou com uma toalha no caso do Peneireiro-vulgar e do Grifo, e levados até à enfermaria onde foram pesados e foi realizada a anamnese prévia à indução anestésica. Para contenção dos animais foram utilizados toalhas e capuz.

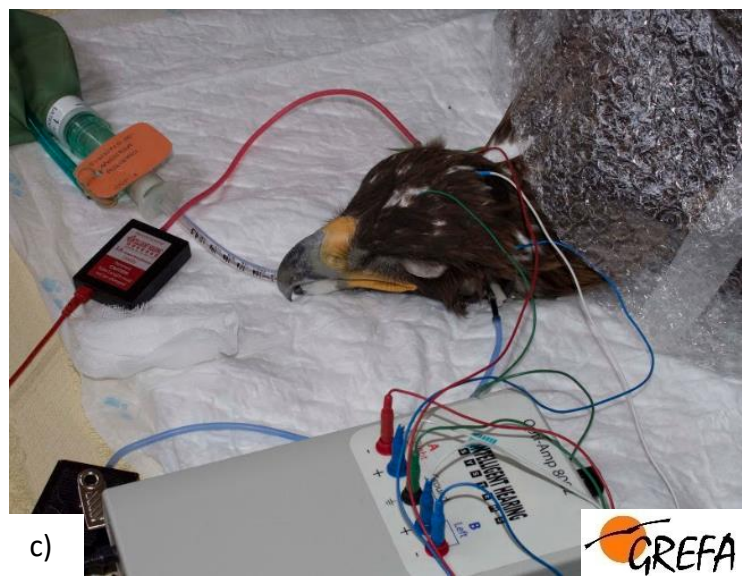
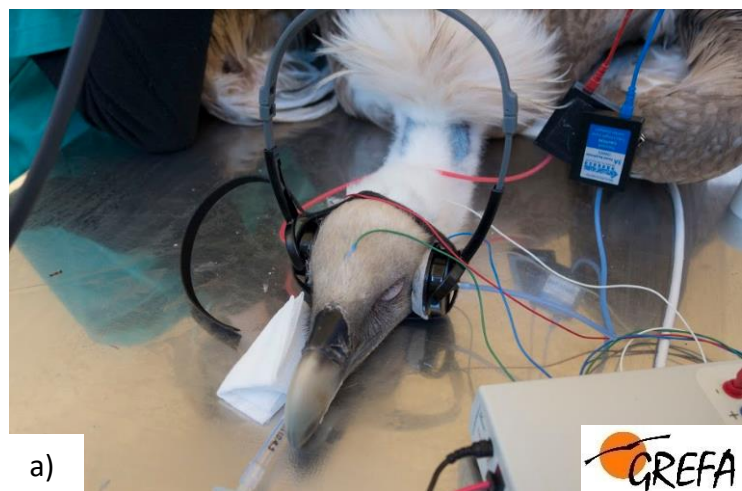
Após indução anestésica com Isoflorano a 5% através de uma máscara, adaptada ao tamanho de cada ave, todas foram entubadas e as garras do Grifo e da Águia-real foram contidas com ligadura (Vetrap). Foram tiradas as medidas da cabeça (antero-posterior e latero-lateral) com um paquímetro. Posteriormente foram envolvidos com plástico com bolhas de ar e sacos de cereais aquecidos para evitar a descida de temperatura. A temperatura manteve-se entre 38,4 e 39,1°C no Grifo, 39,5 e 40,7°C no Peneireiro-vulgar e 39,8 e 41,1°C na Águia-real, sendo esta medida com uma sonda esofágica. As aves foram mantidas a um nível mínimo possível de anestesia, tendo como objetivo apenas prevenir o movimento. Regra geral, a percentagem de manutenção de isoflorano manteve-se entre 1,5 e 3 nas diferentes espécies e o O₂ a 2 l/min/kg com a exceção do Peneireiro-vulgar em que este se manteve a 1 l/min/kg.

Depois dos animais anestesiados e contidos, estes foram colocados em decúbito esternal e foram-lhes colocados uns auriculares adaptados (Figura 11) e posteriormente os elétrodo subcutâneos, previamente desengordurados e desinfetados com álcool.

O vermelho (inversor) foi colocado debaixo do meato auditivo direito, o azul (inversor) debaixo do meato auditivo esquerdo, o branco (não-inversor) na região occipital e o verde (terra) em frente ao branco (Figura 11).

A monitorização da anestesia foi feita de 5 ou 10 em 10 minutos e foram registadas as frequências cardíaca e respiratória, a percentagem de isoflorano e oxigénio correspondentes e a temperatura do animal.

Figura 11 – Fotografias a representar o esquema de elétrodos utilizado e os auriculares adaptados a cada ave (Original).



a) *Gyps fulvus* b) *Falco tinnunculus* c) *Aquila chrysaetos*.

8.3. Estímulos utilizados e processamento

Foram apresentados estímulos sonoros de intensidades e frequências variadas através de auriculares, em modo de rarefação. Começou-se por fazer um varrido de frequências de 25 a 10 000 Hz a uma intensidade de 100 dB em cada um dos ouvidos para determinar o melhor ouvido a utilizar para o teste. Isto foi determinado verificando qual dos ouvidos apresentava os gráficos de onda mais bem delineados (com menos ruído elétrico) e com menor limiar auditivo.

Após determinar qual dos ouvidos apresentava a melhor resposta, este foi sujeito a estímulos tonais de 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000 e 8000 Hz, por esta ordem, e a um clique. Cada uma destas frequências e o clique foram apresentados a intensidades entre os 0-90 dB em intervalo de 10 em 10 dB. O sinal foi transmitido a um ritmo de 35 estímulos por segundo. Por traçado foi efetuada uma média com 450. A resposta foi amplificada pelo sistema com um ganho de 100K e filtrada com um filtro de corta-banda entre os 300 e 3000 Hz e um filtro de entalhe de 50 Hz. Depois de obtidos os gráficos resposta foi ainda filtrado digitalmente no programa *Smart EP* da IHS entre os 150 e 1500 Hz.

9. Análise de dados

Os gráficos de onda resultantes foram analisados visualmente no programa *SmartEP* para determinar que picos considerar para medir latências e amplitudes.

Os picos foram selecionados marcando manualmente com um cursor no ecrã do computador o ponto de maior amplitude de cada onda. Foi também selecionado o correspondente vale subsequente a cada pico, como já foi descrito no capítulo 4.1. “Gráficos de onda”.

Como não existem ainda dados acerca dos geradores anatómicos de RATC nestas espécies, a determinação das ondas foi feita por extrapolação através de dados recolhidos noutras espécies de aves já estudadas.

Estes foram escolhidos no intervalo de latência da resposta entre 1 e 10 ms (intervalo esperado para aparecimento de RATC) e foi atribuído o número romano correspondente a cada pico, por ordem e tendo em conta a média de latências obtidas para cada pico noutros estudos realizados anteriormente em aves (onda I entre 1,5 a 2,5 ms, onda II de 2 a 3 ms e onda III de 2,5 a 3,5 ms) (Brittan-Powell et al., 2002; Gall et al., 2011; J. R. Lucas et al., 2002).

A primeira onda (onda I) foi identificada como a primeira grande deflexão positiva que surge, regra geral, entre os 1,5 e os 2,5 ms. A identificação foi iniciada a intensidades mais altas por resultarem em ondas com maior amplitude e com a morfologia mais bem definida, sendo mais fáceis de identificar. Foi tido também em conta que em intensidades progressivamente mais baixas o início da resposta e consequentemente as diferentes ondas surgiriam mais

tarde que as anteriores. Apenas foi considerada a presença de resposta quando a amplitude era consideravelmente maior que o ruído elétrico de fundo (cerca de 3 vezes maior). Também foi utilizada como base para a sua identificação a morfologia esperada das ondas, com base noutros estudos anteriores. Ao selecionar um pico, as latências e amplitudes associadas eram automaticamente registadas no computador. A amplitude foi considerada a medida do pico ao vale subsequente e a latência a medida desde o momento de apresentação do estímulo até ao pico selecionado (latência absoluta) (Capítulo 4.1. “Gráficos de onda”).

Após a identificação dos picos, a determinação dos limiares auditivos foi também feita por análise visual observando a partir de que intensidade (a cada frequência analisada) deixava de surgir resposta, sendo o limiar a última intensidade na qual surge resposta. A informação recolhida em relação aos limiares de cada frequência foi introduzida no *Microsoft Office Excel 2013* ® de forma a criar uma base de dados para construir o audiograma correspondente de cada animal. Foi feito o mesmo para analisar a relação dos parâmetros do estímulo (intensidade e frequência) com os parâmetros da resposta (amplitude e latência).

10. Gráficos de onda

As três espécies de aves testadas apresentam traçados de resposta com três a cinco picos identificáveis por análise visual nos primeiros 8 ms após a apresentação do estímulo. Nos primeiros 2 a 6 ms surgem pelo menos 3 picos proeminentes que se destacam em relação aos restantes. A morfologia das ondas a diferentes frequências e intensidades e nos diferentes animais foi relativamente semelhante. Regra geral a onda I foi a que apresentou maior destaque (Exemplos de morfologias de resposta de cada animal num teste com estímulo clique e tonal de 2000 e 4000 completo nos anexos).

10.1. *Gyps fulvus*

A resposta de *Gyps fulvus* apresentou traçados de morfologia ambígua e algo inconsistente. Surge também com ruído de fundo algo acentuado a todos os estímulos menos o clique, mesmo após as filtrações. Na maioria dos traçados com resposta identificaram-se os 5 picos característicos da resposta auditiva do tronco cerebral, com 2 picos predominantes a surgir nos primeiros 2 a 6 ms. *Gyps fulvus* não apresentou resposta ao estímulo de 125 Hz (Anexo 3).

10.2. *Falco tinnunculus*

Nos traçados deste animal a morfologia das ondas é consistente, com alguma sobreposição da onda I e II a partir dos 1000 Hz. Por análise visual identificou-se o início da onda I entre os 0,7 e 3,5 ms. Identificam-se visualmente os 5 picos característicos da resposta auditiva. No estímulo clique identificou-se resposta a todas as intensidades testadas de 10dB SPL a 90dB SPL. Em quase todos os gráficos de resposta identificados é possível encontrar as 5 ondas. Além disto, aos 125, 250, 4000 e 8000 Hz, entre os 60 e 90 dB SPL de intensidade, surgem a partir dos 6 a 7 ms um conjunto de 3 ondas repetíveis (Anexo 4).

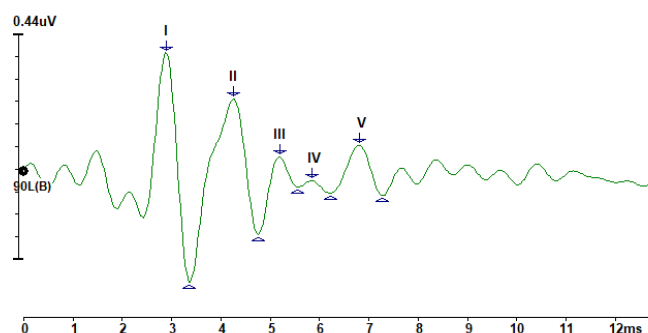
10.3. *Aquila chrysaetos*

Nesta ave os traçados foram bastante consistentes, as 3 ondas proeminentes surgem entre os 1,5 e os 6 ms após apresentação do estímulo. Além das 5 ondas iniciais, foram encontradas mais 3 ondas repetíveis, a partir dos 6 a 7ms, aos 125, 250 e 8000 Hz entre os 70 a 90 dB SPL (Anexo 5).

10.4. Comparações entre aves

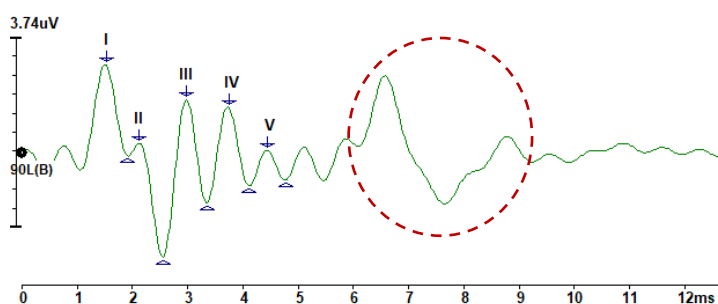
Os gráficos 5 a 7 a seguir apresentados tratam-se de traçados das frequências de melhor audição das três aves a 90 dB (intensidade de melhor resposta) para demonstrar e comparar a morfologia das ondas da resposta nervosa auditiva de cada ave. Estas demonstraram morfologia semelhante com pelo menos três picos proeminentes.

Gráfico 5 – Resposta interpretada de *Gyps fulvus*, a um estímulo de 2000 Hz a 90 dB SPL de intensidade.



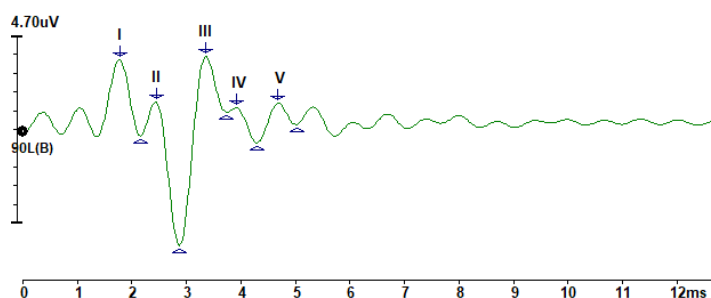
Esta surge com uma latência mais prolongada que as restantes, ocorrendo alguma separação entre a onda I e II.

Gráfico 6 – Resposta interpretada de *Falco tinnunculus*, a um estímulo de 4000 Hz a 90 dB SPL de intensidade.



O círculo a vermelho picotado indica ondas atípicas de amplitude significativa, não compatíveis com resposta do tronco cerebral.

Gráfico 7 – Resposta interpretada de *Aquila chryaetos*, a um estímulo de 2000 Hz a 90 dB SPL de intensidade.



11. Latências e Amplitudes das ondas

11.1. *Gyps fulvus*

Verificou-se uma tendência para diminuição dos valores de latência, em todas as ondas, com o aumento da intensidade do estímulo. Os valores de latência variaram entre os 2,27 e os 7,47 ms, na resposta ao estímulo de clique (Gráfico 8).

Verificou-se também uma tendência para o aumento da amplitude mais marcado na onda I, com o aumento da intensidade do estímulo. Também se verificou um aumento da amplitude, embora menos significativo, das ondas II e III, com o aumento da intensidade. Os valores de amplitude entre os 0,01 e 1,76 μV , na resposta ao estímulo de clique (Gráfico 9).

Gráfico 8 – Relação entre a latência e intensidade das ondas de resposta de *Gyps fulvus* ao clique.

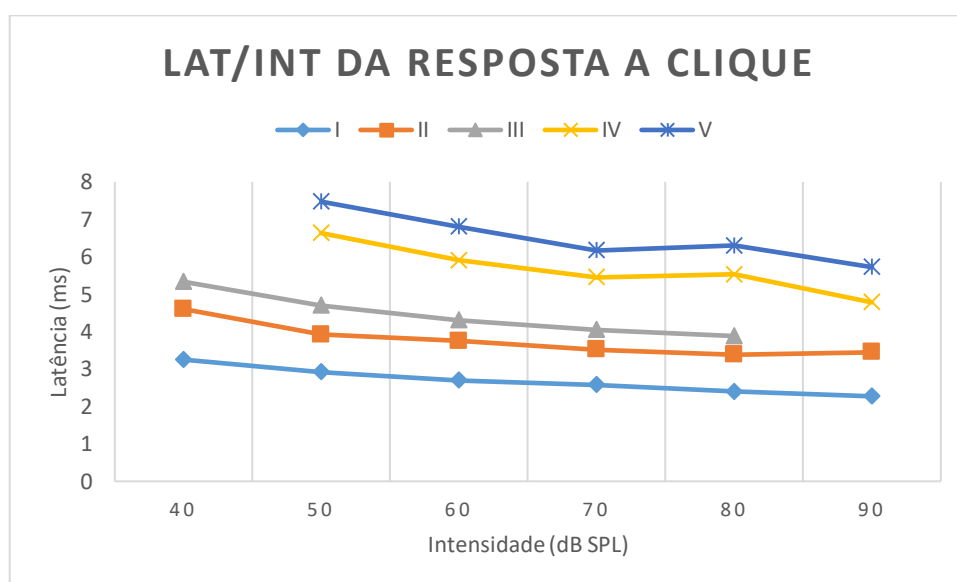
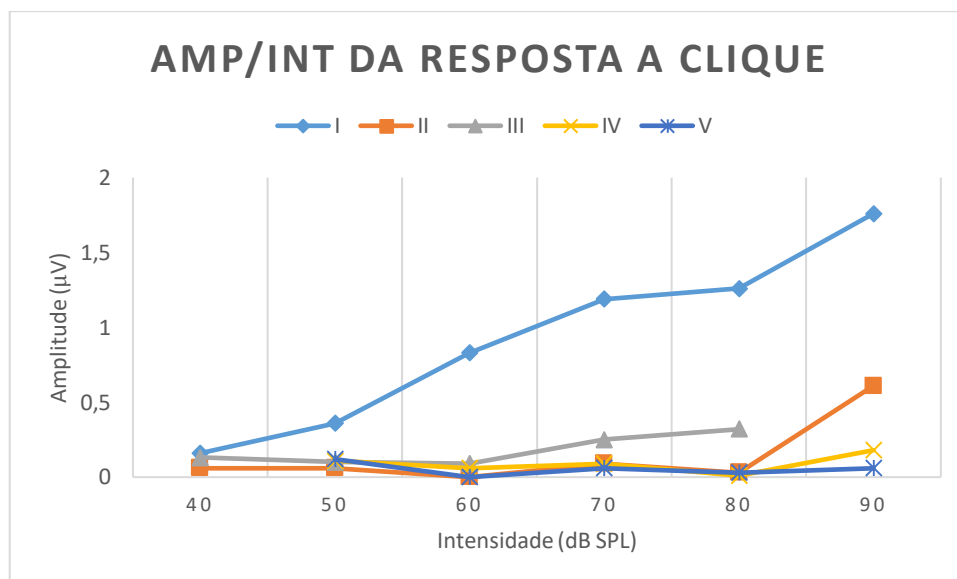


Gráfico 9 – Relação entre a amplitude e intensidade das ondas de resposta ao clique no exemplar de *Gyps fulvus*.



11.2. *Falco tinnunculus*

Verificou-se uma tendência para a diminuição da latência com o aumento da intensidade do estímulo. Os valores de latência variaram entre os 1,27 e os 5,72 ms (Gráfico 10).

Verificou-se também uma tendência para o aumento da amplitude com o aumento da intensidade do estímulo, que é consideravelmente mais visível na onda I. Os valores de amplitude variaram entre os 0,05 e os 8,83 µV (Gráfico 11).

Gráfico 10 – Relação entre a latência e intensidade das ondas de resposta de *Falco tinnunculus* ao clique.

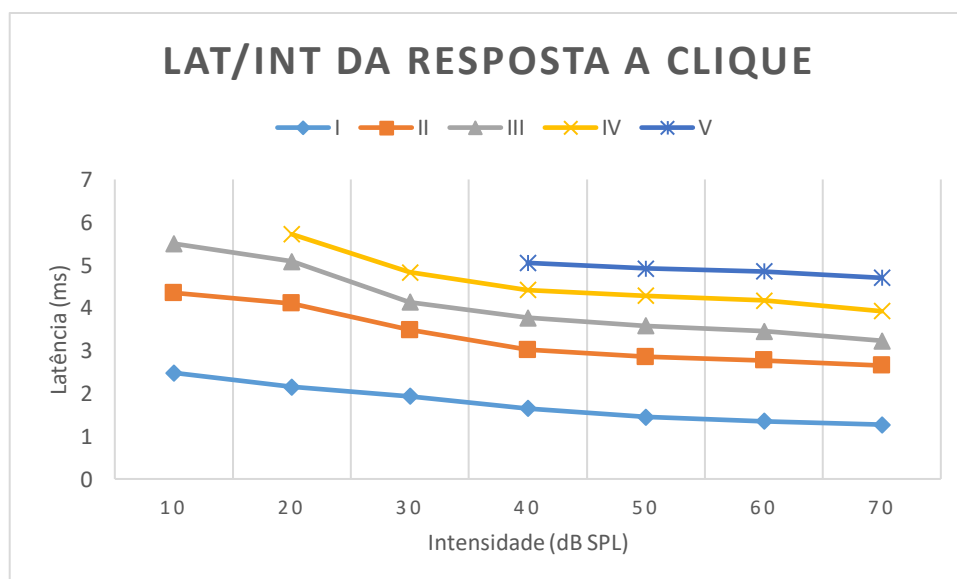
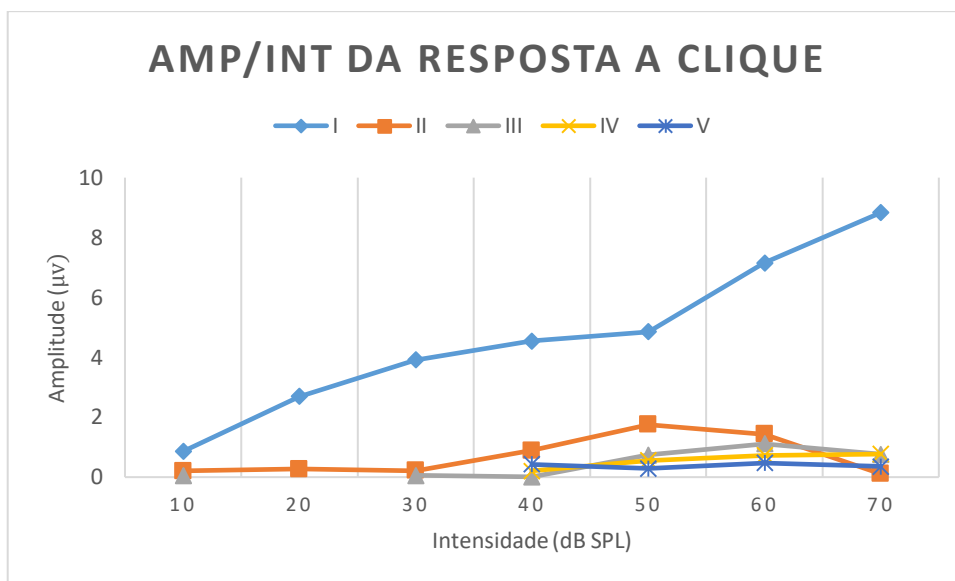


Gráfico 11 – Relação entre a amplitude e intensidade das ondas de resposta de *Falco tinnunculus* ao clique.



11.3. *Aquila chrysaetos*

As latências mostram uma tendência para diminuir com o aumento da intensidade de forma consistente. Os valores de latência variaram entre os 1,13 e os 5,10 ms (Gráfico 12).

A amplitude mostrou uma propensão mais marcada para aumentar com o aumento da intensidade que nos casos anteriores, sendo marcada tanto na onda I como na II. Verificou-se também um pico de amplitude, mais marcado nas três primeiras ondas (I, II e III), quando apresentado um estímulo de 70 dB SPL, indicado pelo círculo vermelho picotado no gráfico 13. Os valores de amplitude registados encontraram-se entre os 0,04 e os 6,42 µV (Gráfico 13).

Gráfico 12 – Relação entre latência e intensidade da resposta de *Aquila chrysaetos* a um estímulo clique.

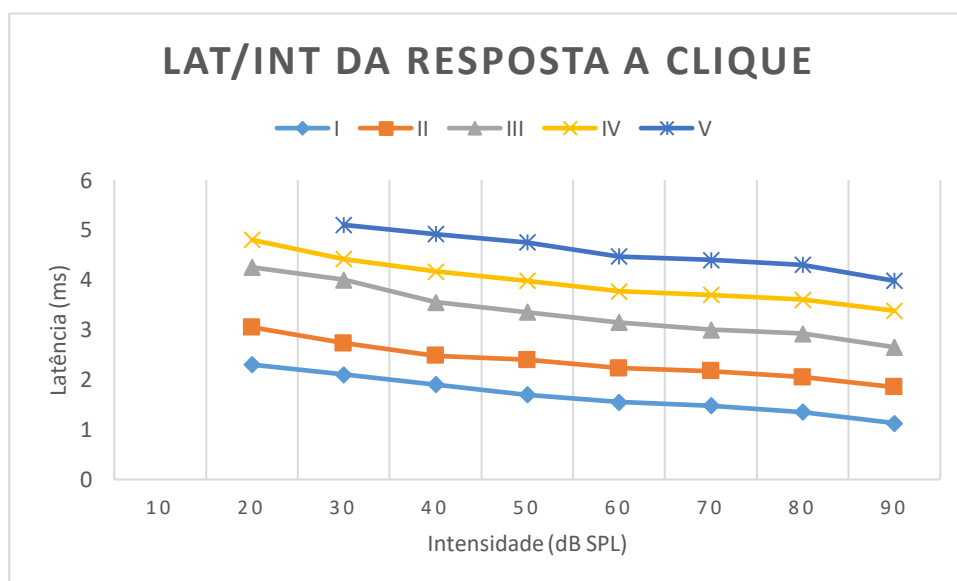
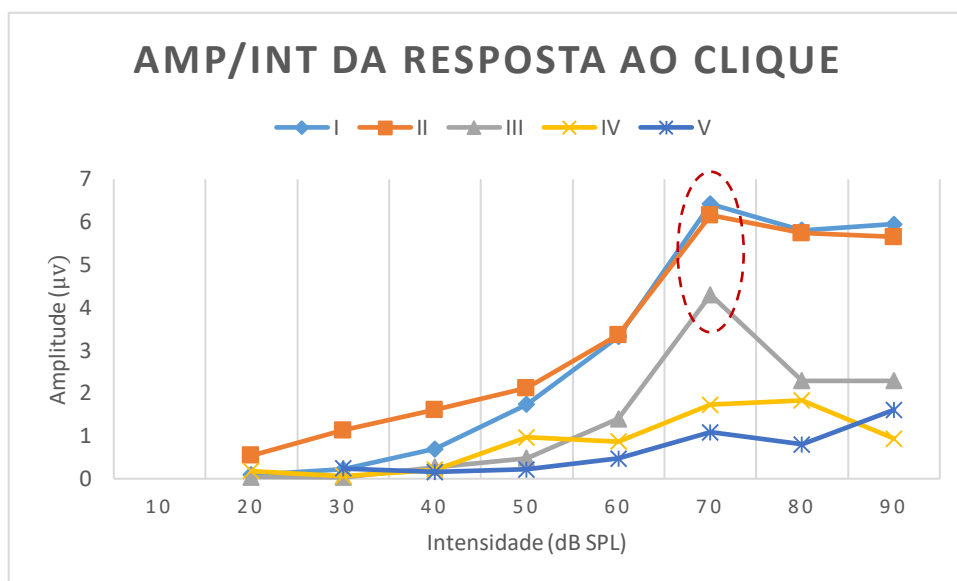


Gráfico 13 – Relação entre amplitude e intensidade da resposta de *Aquila chrysaetos* a um estímulo clique.



11.4. Comparações entre aves

Consoante os gráficos anteriores, a onda com resultados mais marcados e consistentes de amplitude e latência foi a I. Portanto, foi esta a onda utilizada para comparar os efeitos da intensidade e frequência do estímulo na amplitude e latência das respostas das três aves.

As amplitudes da onda I no geral mostraram tendência a aumentar com o aumento da intensidade, em todas as aves testadas. *Falco tinnunculus* apresentou no geral as maiores amplitudes e *Gyps fulvus* as menores (Gráfico 14).

As latências da onda I tendem a diminuir com o aumento da intensidade, em todas as aves testadas. *Falco tinnunculus* e *Aquila chrysaetos* apresentaram valores de latência semelhantes, mas *Gyps fulvus*, por sua vez, apresentou latências no geral mais elevadas apesar de apresentarem uma tendência semelhante (Gráfico 15).

As amplitudes têm tendência a aumentar até alcançar os 2000, frequência a partir da qual estas diminuem marcadamente em *Falco tinnunculus* e *Aquila chrysaetos* e mais subtilmente em *Gyps fulvus* (seta vermelha no gráfico 16). *Falco tinnunculus* apresenta os maiores valores de amplitude de ondas e *Gyps fulvus* os mais baixos (Gráfico 16).

As latências apresentam valores bastante semelhantes entre *Falco tinnunculus* e *Aquila chrysaetos*, sendo no geral maiores em *Gyps fulvus*. Em *Aquila chrysaetos* verifica-se um pico de diminuição da latência da onda I (1,43 ms) aos 1000 Hz. *Gyps fulvus* apresentou a menor latência (2,75 ms) aos 500 Hz e *Falco tinnunculus* aos 4000 Hz (1,55 ms) (setas vermelhas no gráfico 17).

Os valores de latência inter-picos I-III mantiveram-se relativamente constantes com a variação de intensidade com duas exceções: *Falco tinnunculus* apresenta um aumento

progressivo de latência dos 30 aos 10 dB SPL; *Gyps fulvus* apresenta um aumento de latência de 80 para 90 dB (Gráfico 18).

Os valores de latência I-V mantiveram-se relativamente constantes com a variação de intensidade, com a exceção *Gyps fulvus* que apresenta uma diminuição da latência aos 70 dB (Gráfico 19).

Gráfico 14 – Amplitudes da onda I, em resposta ao estímulo clique a diferentes intensidades, nos três animais.

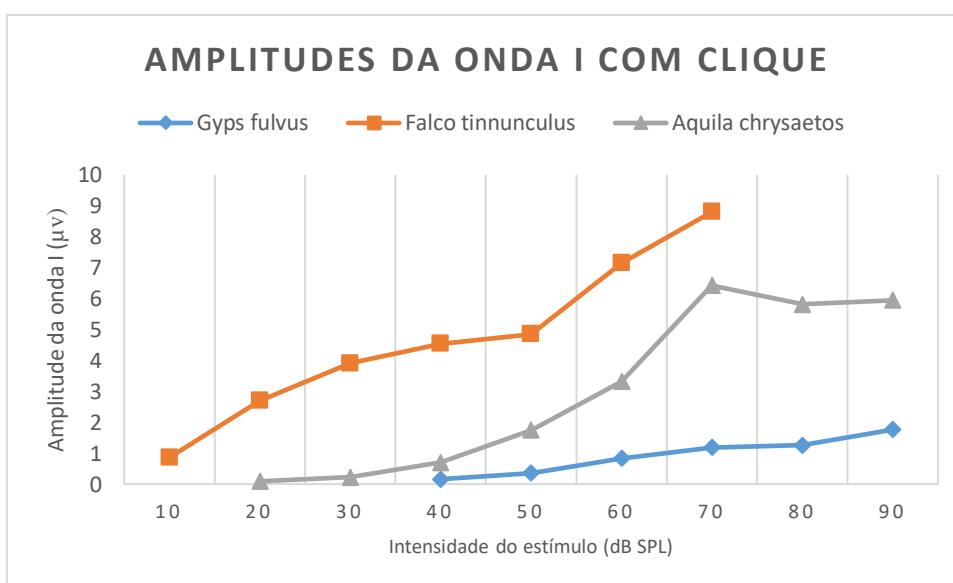


Gráfico 15 – Latências da onda I, em resposta ao estímulo clique a diferentes intensidades, nos três animais.

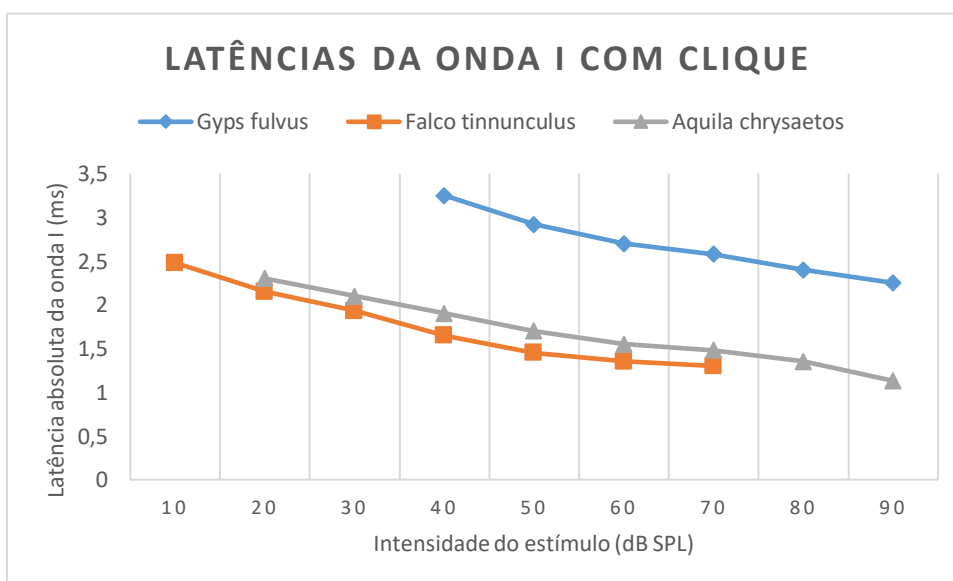


Gráfico 16 – Amplitudes da onda I em resposta a um estímulo com intensidade de 90 dB SPL a diferentes frequências, nas três aves.

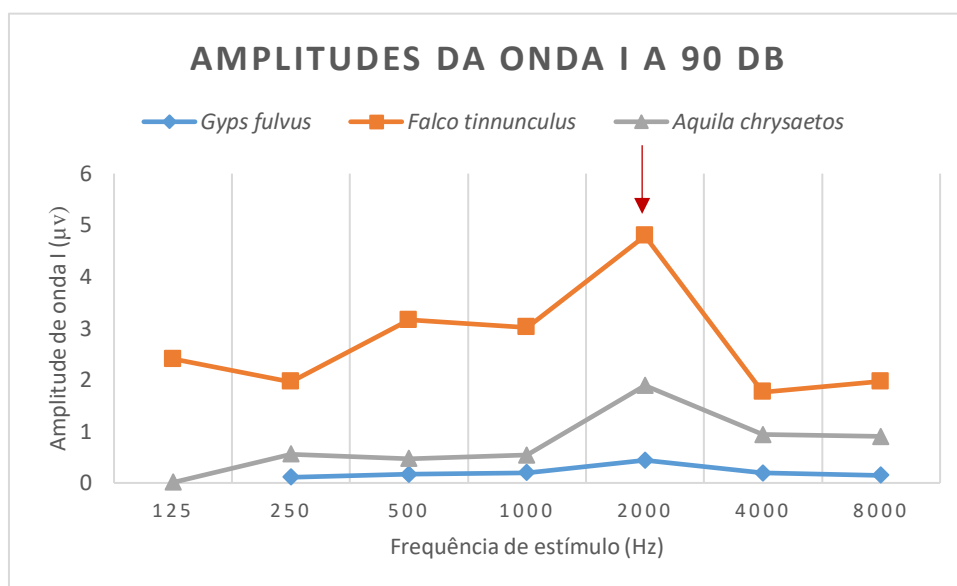


Gráfico 17 – Latências da onda I em resposta a um estímulo com intensidade de 90 dB SPL a diferentes frequências, nas três aves.

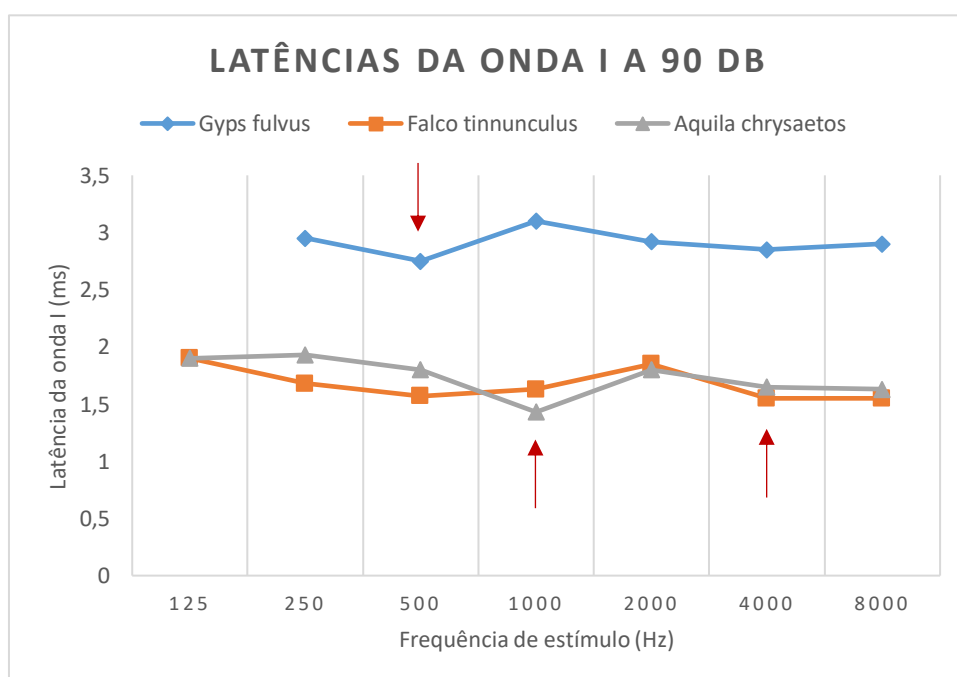


Gráfico 18 – Variação das latências inter-pico I-III, com variação da intensidade de um estímulo clique.

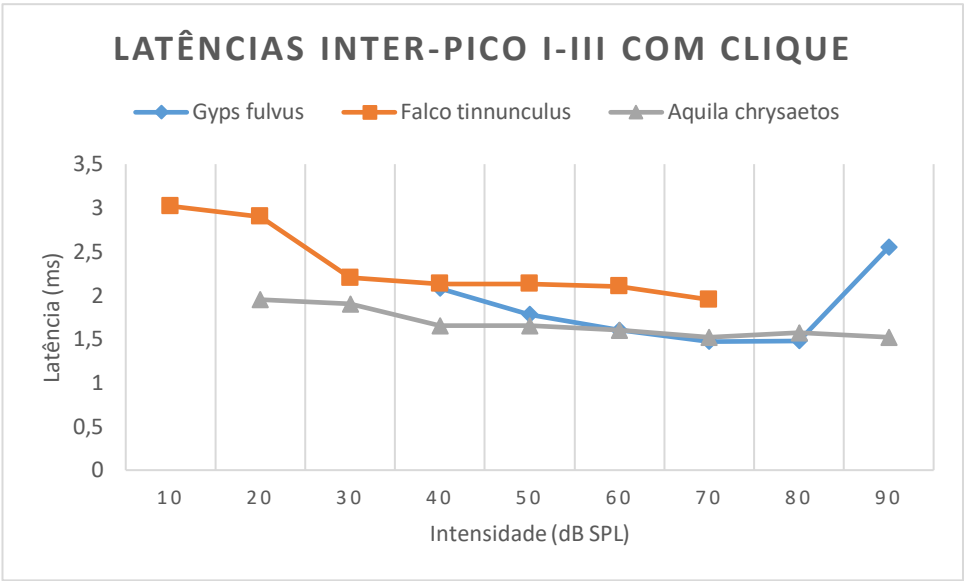
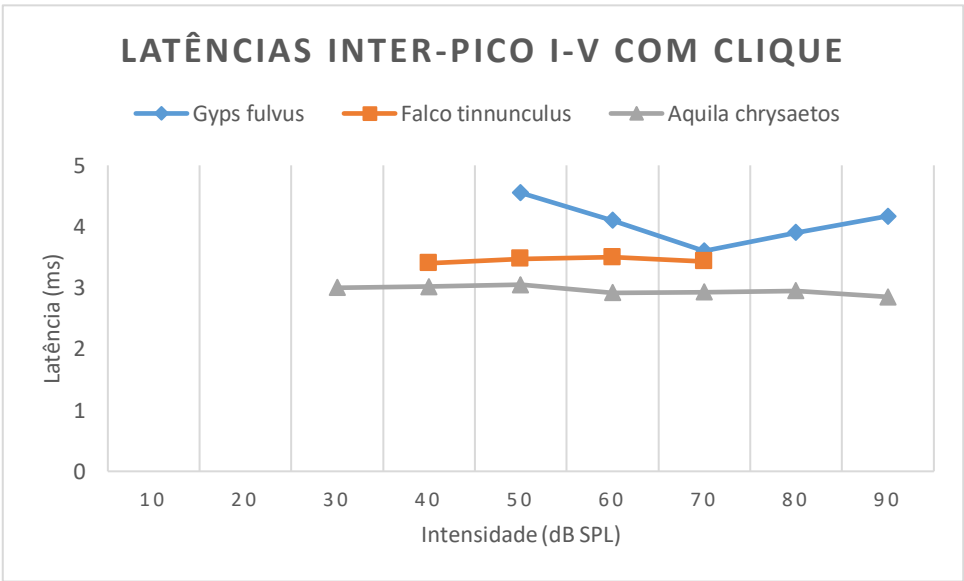


Gráfico 19 – Variação das latências de I-V, com variação da intensidade de um estímulo clique.



12. Limiares auditivos e audiogramas

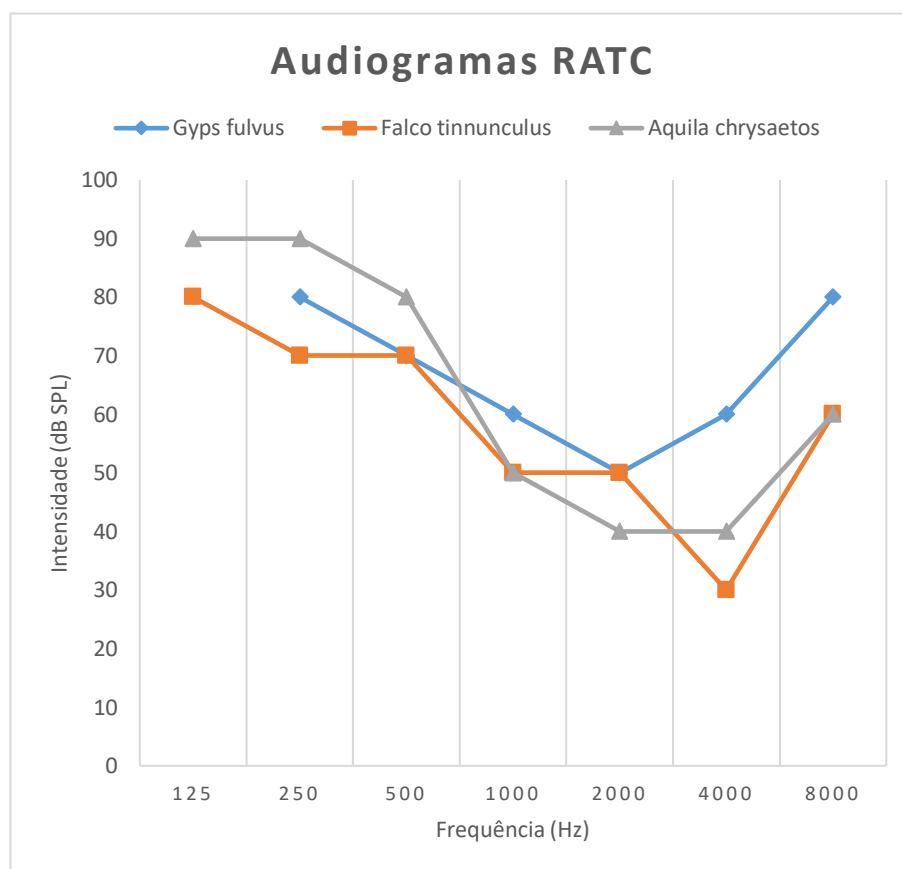
Os audiogramas resultantes, nas três aves, apresentam uma forma em U. A zona de maior sensibilidade (menores limiares, maiores amplitudes, menores latências) variou de acordo com a ave, apesar de em todos se enquadrar entre os 1000 e 4000 Hz, com uma diminuição marcada da sensibilidade auditiva após os 4000 Hz (Gráfico 20). Os limiares mais baixos surgiram em resposta ao estímulo clique.

O limiar auditivo mais baixo foi encontrado em *Falco tinnunculus*, surgindo resposta aos 10 dB de intensidade no estímulo clique. Este apresentou gráfico identificável de resposta a todas as frequências testadas. No audiograma, a descida do valor dos limiares até à frequência de melhor audição foi progressiva, até alcançar o limiar mais baixo registado nas três aves (com estímulo tonal) de 30 dB aos 4000 Hz (Gráfico 20).

O exemplar de *Aquila chrysaeteos* apresentou o maior limiar (90 dB) aos 125 e 250 Hz. Apresentou também a zona de melhor audição mais abrangente, entre os 2000 e os 4000 Hz, visto que o seu limiar auditivo mais baixo é 40 dB SPL e sucede em ambas estas frequências (Gráfico 20).

No geral, *Gyps fulvus* apresentou os limiares auditivos mais elevados. A sua frequência de melhor audição corresponde aos 2000 Hz, em que foi detetada resposta a partir dos 50 dB SPL, sendo este o limiar de sensibilidade mais alto registado (Gráfico 20).

Gráfico 20 – Comparação dos audiogramas dos três animais testados.



Falco tinnunculus foi a ave que apresentou o limiar auditivo absoluto mais baixo, atingindo os 30 dB aos 4000 Hz. É possível observar que os três exemplares testados possuem a mesma tendência para apresentar uma diminuição do limiar auditivo até alcançar o mais baixo (na frequência de melhor audição) a partir do qual há uma subida relativamente repentina, resultando num formato aproximadamente em U.

A análise descritiva dos resultados foi feita com base em 3 componentes principais: morfologia geral da resposta; análise da relação dos parâmetros do estímulo (intensidade e frequência) com os parâmetros da resposta (amplitude e latência); distinção entre ruído elétrico e componentes neurológicos de resposta (deteção de ondas e limiares de sensibilidade absoluta).

Visto só terem sido conseguidos dados de três aves de espécies diferentes, não existindo, portanto, uma amostra estatisticamente significativa, foi realizada uma análise descritiva. Esta consistiu na caracterização da sensibilidade auditiva destas três aves e comparação das suas características entre si e com dados de outros estudos semelhantes. Com esta análise, além de uma estimativa de sensibilidade auditiva de cada indivíduo, podemos avaliar a viabilidade do teste nestas aves, abrindo precedente nestas espécies.

13. Gráficos de onda

Os gráficos de onda resultantes do teste cumpriram as requisições necessárias para se considerar uma resposta de RATC válida, segundo a Sociedade Britânica de Audiologia, nomeadamente: resposta clara, ou seja, elevado grau de correlação entre as replicações; os gráficos de onda apresentaram no geral as características de amplitude, latência e morfologia esperadas para o que se sabe em aves e a maior onda da resposta foi no mínimo três vezes maior que o ruído de fundo (Hall, 2015).

As RATC dos animais testados assemelharam-se em morfologia às respostas a estímulos equiparáveis, obtidas noutras espécies anteriormente testadas, na sua maioria passeriformes como *Molothrus ater*, *Agelaius phoeniceus*, *Taeniopygia guttata*, *Passer domesticus*, entre outras. Foram também testados posteriormente, com resultados equiparáveis, exemplares de *Melopsittacus undulatus* e algumas rapinas noturnas como *Megascops asio* e *Tyto alba* (Brittan-Powell et al., 2002, 2005; Gall et al., 2011; K. S. Henry & Lucas, 2009; Moiseff & Konishi, 1981; Wolf et al., 2017).

Apesar disto, *Gyps fulvus*, apresentou alguma ambiguidade na morfologia das ondas que juntamente com o ruído de fundo algo aumentado, mesmo após a filtração digital, pode indicar interferência elétrica durante a realização do teste a esta ave. Esta contaminação pode ter origem na ave, podendo ser neurológica (p.e. anestesia superficial) ou miogénica (movimentos musculares), ou do ambiente (p.e. aparelhos eletrónicos ligados) (Hall, 2015).

Foram identificados mais picos repetíveis (5) do que na maioria dos estudos mais recentes de RATC em aves, em que o mais comum é observar apenas 1 a 3 picos de resposta (Brittan-Powell & Dooling, 2004; Brittan-Powell et al., 2002, 2005; Caras, Brenowitz, & Rubel, 2010; Gall et al., 2011; K. S. Henry & Lucas, 2009; Kenneth S Henry & Lucas, 2010;

Kraemer, Baxter, Hendrix, & Carr, 2017; Lohr et al., 2013; J. R. Lucas et al., 2002; Wolf et al., 2017). O registo clássico completo de audiometria, típico de humanos e mamíferos, possui 5 picos representando diferentes porções do caminho auditivo, como já foi mencionado antes no capítulo 4.1. “Gráficos de onda”.

Em três estudos mais antigos em juvenis de *Gallus domesticus* já foram identificados até 6 picos positivos na resposta (Beck, Brown-Borg, & Jones, 1987; Brown-Borg et al., 1986; Jones et al., 1987; Katayama, 1985), noutro em *Anas platyrhynchos* poucos dias após eclosão, em que os elétrodos foram implantados intracranialmente, foram registadas até 5 (Dmitrieva & Gottlieb, 1994).

Uma hipótese para justificar este resultado poderá ser que a utilização de auriculares em vez das típicas colunas utilizadas até agora em estudos de RACT em aves poderá ter melhorado a qualidade da resposta, eliminando a distância (tipicamente 30 cm) entre a coluna e o meato auditivo externo. A melhoria da resposta seria devido a maior atenuação do ruído de fundo, maior atenuação inter-aural (atenuação da intensidade do estímulo que chega ao ouvido contrário ao estimulado) e melhor direcionamento do estímulo resultando em maior viabilidade. Em três dos estudos em que foram identificados mais picos foi aplicado um tubo condutor do som até ao ouvido que também poderá ter algum efeito neste sentido, algo que não se observa nos estudos mais recentes (Beck et al., 1987; Brown-Borg et al., 1986; Jones et al., 1987).

O esquema de elétrodos utilizados também poderá ter alguma influência, visto que se utilizou o de dois canais (4 elétrodos), descrito anteriormente no capítulo 3.2.5.1.1. - “Esquemas de elétrodos”, em vez do mais utilizado de 1 canal (3 elétrodos) nos estudos utilizados neste trabalho como referência. Já foi descrito que em humanos adultos a utilização do esquema de dois canais pode facilitar a identificação da onda I. Em humanos também já se demonstrou que a utilização de registos de canais múltiplos poderá revelar componentes adicionais ao tradicionalmente identificado em registos de canal único (Hall, 2015). Assim sendo é possível que tenha acontecido o mesmo com as RATC destas aves. Os elétrodos intracraniais, como utilizado no estudo de *Anas platyrhynchos* (em que foram identificadas 5 ondas de resposta) poderão ter mais precisão mas trata-se de um método muito invasivo.

Também é possível que tenha sido erro de interpretação, visto que a identificação das ondas foi feita com o método visual tornando-se algo subjetivo. Apesar disto, esta técnica foi a que resultou até agora na maior aproximação aos limiares de estudos comportamentais, daí ter sido a escolhida para este trabalho (Hill, 2011; Ramsier & Dominy, 2010).

O achado de a onda I ser a que apresentou a maior amplitude é compatível com outros estudos realizados em aves, sendo a primeira a ser identificada, enquanto em mamíferos isto se aplica para a onda V.

A onda I é a mais consistentemente atribuída ao nervo auditivo na maioria dos animais testados até à data (Brittan-Powell et al., 2002, 2005; Brown-Borg et al., 1986; Katayama, 1985; Scheifele & Clark, 2012). Dada a semelhança de latência e a morfologia da onda destas três aves com o já registado em estudos efetuados a outras espécies de aves, existem fortes evidências de que o nervo auditivo é o desencadeador nervoso para a onda I nestas espécies.

Como já foi referido anteriormente no capítulo 4.2. “Origem anatómica das ondas” e tal como acontece em outras espécies de aves, as restantes ondas não têm uma contribuição tão significativa sendo de origem anatómica dúbia, visto que ainda não existem estudos suficientes para inferir com mais certeza acerca deste assunto.

Posto isto, com base em comparações efetuadas com resultados de outros estudos, fundamentadas nas características de latência e morfologia das ondas, chegou-se à conclusão que neste estudo a onda III poderá corresponder ao núcleo laminar, demonstrando semelhanças com a onda II em Brittan-Powell et al. (2002). Por outro lado a onda II poderá tratar-se de uma porção proximal do nervo auditivo, como se verifica em canídeos (Scheifele & Clark, 2012) ou, estando entre o nervo auditivo e o núcleo laminar e sendo o nervo auditivo mais pequeno em aves (Caras et al., 2010), poderá ter origem dos núcleos angular e/ou magnocelular, correspondendo à onda II em Katayama (1985). Esta análise é especulativa, não existindo evidências suficientes neste estudo para tirar conclusões acerca da origem anatómica destas ondas, visto que não foi desenhado para tal. Em relação às restantes ondas, não foram encontrados dados que permitam comparações, apesar de em alguns estudos (Beck et al., 1987; Brown-Borg et al., 1986; Jones et al., 1987; Katayama, 1985) se ter identificado a origem de até 5 ondas em *Gallus domesticus*, as ondas IV e V não têm morfologia equiparável às deste estudo.

As ondas que surgiram repetidamente com morfologia semelhante em resposta a alguns estímulos (às frequências mais baixas e mais altas testadas, às maiores intensidades) a partir dos 6 a 7 ms (Gráfico 6), poderiam ser resultado de uma interferência elétrica, mas tendo em conta a consistência das características das ondas e condições em que surgem e o facto de os testes terem sido realizados em dias diferentes, esta hipótese torna-se improvável. Estas podem ter surgido, no entanto, pelas mesmas razões descritas anteriormente para justificar a identificação de 5 em vez de 2 ou mais ondas de resposta, podendo tratar-se de ondas de resposta de média latência.

14. Latências e amplitudes das ondas

Nestes parâmetros verificou-se uma variação significativa entre indivíduos. Não foram comparadas as latências e amplitudes de todas as ondas de resposta, mas foi utilizada a

onda considerada mais representativa das características da resposta (com maior amplitude e morfologia mais consistente), a I, para comparar estes parâmetros entre as aves testadas. O grifo, *Gyps fulvus* destacou-se com valores de latência maiores e amplitudes menores que qualquer um dos outros e também comparativamente aos valores de referência. Isto poderá ser uma indicação de que a sua sensibilidade auditiva é mais fraca do que a das outras aves. Pelo contrário, o Peneireiro-vulgar, *Falco tinnunculus*, apresentou os valores de latência da onda I mais baixos das três aves e os valores de amplitude maiores, sugerindo maior sensibilidade.

A influência que a intensidade apresentou sob a latência e amplitude das ondas é compatível com estudos anteriores. O aumento da amplitude com o aumento da intensidade é associado a um recrutamento de maior número de fibras nervosas em simultâneo e a concomitante diminuição da latência, por sua vez, resulta da ativação de uma porção mais basal da cóclea. Isto sucede porque a onda viajante demoraria mais a chegar à zona mais apical, aumentando a latência, nesse caso (Hall, 2015).

As maiores amplitudes foram detetadas, em todos os animais, aos 2000 Hz, em resposta a um estímulo de 90 dB. Estas costumam coincidir com as frequências de melhor audição, tal como as latências mais baixas. Esta tendência foi observada em *Gyps fulvus* e *Aquila chrysaetos* mas não em *Falco tinnunculus*, cuja frequência de maior sensibilidade é 4000 Hz, apesar de apresentar as maiores amplitudes de ondas aos 2000 Hz.

Em *Aquila chrysaetos* o limiar auditivo foi igual aos 2000 e aos 4000 Hz, tendo 2 frequências de maior sensibilidade auditiva. No entanto como aos 2000 Hz se verificaram maiores amplitudes poder-se-á considerar esta a verdadeira frequência de maior sensibilidade para esta ave.

Em resposta ao estímulo de clique, as ondas (principalmente as 3 primeiras) de *Aquila chrysaetos* apresentaram um pico de amplitude aos 70 dB. Visto tratar-se de uma ocorrência pontual, o mais provável é que seja um caso de interferência de ruído elétrico. É frequente também obterem-se registos mais claros a 60 e 70 dB do que a maiores intensidades. Especula-se que intensidades maiores poderão por vezes desencadear mecanismos de defesa da cadeia de ossículos em vez aumentar o estímulo (Hall, 2015).

Não se detetou uma dependência consistente entre a latência das ondas e a frequência do estímulo, encontrando-se os valores mais baixos de latência entre os 500 e 1000 Hz. Apesar de isto coincidir com outros estudos encontrados em aves (K. S. Henry & Lucas, 2009; Jeffrey R Lucas, Henry, Gall, & Vélez, 2016), na maior parte dos estudos foi observado que as menores latências coincidem com as frequências intermédias, correspondentes à zona de maior sensibilidade (Beatini, Proudfoot, & Gall, 2018; Brittan-Powell et al., 2002; Dmitrieva & Gottlieb, 1994; Kenneth S. Henry & Lucas, 2008; Wolf et al., 2017). Isto poder-se-á justificar pelo recrutamento de fibras nervosas de condução mais rápida (Scheifele & Clark, 2012).

As latências inter-picos, no geral, mantiveram valores constantes com a variação da intensidade do estímulo como já foi verificado em outros estudos (Brittan-Powell et al., 2002). Estas representam o tempo de condução do sinal ao longo do caminho nervoso auditivo, que não é significativamente influenciado pela intensidade do sinal sonoro.

Poderia também ter sido interessante ver o efeito da variação da taxa de apresentação do estímulo na latência e amplitude das ondas, mas as respostas foram gravadas com uma taxa de apresentação de 35 estímulos por segundo. O que sucede normalmente é que com o aumento da taxa de apresentação existe uma diminuição da amplitude da resposta e aumento da latência, provavelmente por fadiga ou adaptação dos neurónios. (Brittan-Powell et al., 2002, 2005) Se se tivesse confirmado esta situação neste estudo, seria mais uma evidência de que o teste de facto foi bem sucedido, validando os resultados obtidos e ajudando ao caso de que este teste pode ser feito com sucesso nestas espécies.

15. Limiares auditivos e audiogramas

No geral, através da interpretação dos audiogramas, verificou-se que os três animais ouvem melhor entre frequências de 1000 a 4000 Hz com sensibilidade absoluta a aproximar os 30 dB SPL na frequência de maior sensibilidade.

A frequência de maior sensibilidade (menores limiares, maiores amplitudes, menores latências), que normalmente se encontra entre os 2000 a 3000 Hz, apresentou valores mais altos que o esperado nestas aves, visto que *Falco tinnunculus* apresentou maior sensibilidade aos 4000 Hz e *Aquila chrysaetos* também apresentou elevada sensibilidade a esta frequência. Este resultado podia ser esperado numa rapina noturna, mas não em espécies diurnas, partindo da comparação com resultados de testes nestas aves (Brittan-Powell et al., 2005; Kraemer et al., 2017; Kuokkanen, Kraemer, Kempter, & Carr, 2018). Exceto a frequência de maior sensibilidade, estes resultados coincidiram com as tendências gerais encontradas em estudos anteriores de sensibilidade auditiva, em aves adultas referidos no capítulo 1. “Audição em aves” e 3.2.1. “RATC em aves”.

Isto contribui para a credibilidade dos resultados e possível viabilidade do teste pois ajuda à premissa de que estes testes (mais especificamente este protocolo), são válidos para a caracterização de sensibilidade auditiva nestas espécies de aves.

Não foram encontrados registos de estudos auditivos, quer comportamentais quer eletrofisiológicos, em nenhuma das espécies testadas, não se podendo eliminar a hipótese de se tratar de variação entre espécies. Falhas técnicas como erros associados aos elétrodos, erros de protocolo como parâmetros mal definidos de estímulo ou aquisição ou até interferência elétrica são causas possíveis para a existência de resultados atípicos que poderão levar a identificação de resposta onde ela não existe (Hall, 2015). Outra possível

causa será erro do operador, existindo a hipótese da escolha dos limiares ter sido feita incorretamente, que é plausível dada subjetividade da técnica de deteção visual.

Estas causas podem também justificar as diferenças anteriormente mencionadas na latência e amplitude das ondas, sendo que o caso da identificação visual também se aplica, mas na determinação de picos em vez de limiares.

As comparações feitas entre os resultados deste trabalho e estudos efetuados posteriormente, são entre espécies diferentes, mas com o fundamento de que em aves não foi identificada até à data uma diferença significativa entre espécies, com a exceção já mencionada das rapinas noturnas.

Apesar de se encontrar dentro dos parâmetros ditos normais, *Gyps fulvus* foi a ave testada que apresentou as respostas compatíveis com menor sensibilidade auditiva. Foi a que registou respostas com amplitudes mais baixas e latências mais altas, em iguais condições de estímulo e recolha de sinal, entre os três indivíduos. Além disto foi a única que não apresentou resposta aos 125 Hz. Mais importante, é o facto de ter apresentado os limiares mais altos, no geral, e o maior limiar de sensibilidade absoluta em resposta a estímulos tonais. Isto significa que o estímulo deixa de desencadear resposta visível a intensidades relativamente altas, não identificando sons mais suaves. Neste caso em particular a sons abaixo de 50 dB não foi desencadeada resposta, para as frequências testadas. Estes resultados podem ter justificação no facto de se tratar da ave testada de maior envergadura. Isto porque existem evidências de que aves de maior tamanho têm o pico de sensibilidade a frequências mais baixas e um limite auditivo superior mais baixo. Têm também tendência a produzir sons de menores frequências. Pode-se considerar a existência de uma relação entre o tamanho do corpo, a produção de som e a sensibilidade auditiva. Também poderá ter a ver com o facto de se alimentar essencialmente de carcaças de grandes animais, não tendo a necessidade de identificação de sinais sonoros de presas. (Lovette & Fitzpatrick, 2016) Tudo isto considerando que a causa desta diferença poderá ser variação entre espécies. No entanto, os erros que podem surgir na deteção e análise de RATC, mencionados anteriormente, também poderão ser uma causa possível.

Por outro lado, as outras duas aves apresentaram características dentro dos parâmetros considerados normais com base em outros estudos em aves. *Falco tinnunculus* foi a que apresentou maior sensibilidade auditiva; apresentou os limiares mais baixos (com a exceção do limiar da *Aquila chrysaetos* aos 2000 Hz) e limiar de sensibilidade absoluta a estímulo tonal mais baixo de entre os três, de 30 dB, e no geral as amplitudes mais altas e latências mais baixas.

Aquila chrysaetos revelou sensibilidade auditiva intermédia em relação aos outros dois exemplares. Estas duas últimas espécies necessitam de caçar para se alimentar, necessitando para tal, em teoria, de uma audição mais apurada que *Gyps fulvus* (Cooper, 2002). Não foram encontrados dados fidedignos em relação ao espectro vocal destas

espécies, não podendo determinar se coincide com a zona de maior sensibilidade auditiva. Isto verificou-se em estudos realizados em aves canoras (K. S. Henry & Lucas, 2009; Kenneth S. Henry & Lucas, 2008).

As três aves apresentaram o limiar mais baixo em resposta ao estímulo de clique, identificando-se com este estímulo o limiar absoluto mais baixo registado de 10 dB em *Falco tinnunculus*. Ao emitir um maior espectro de frequências, foi estimulada uma porção mais abrangente da cóclea resultando em maior facilidade em estimular o nervo auditivo, mesmo a intensidades mais baixas (Hall, 2015).

A diferença entre os valores dos limiares determinados neste trabalho e estudos comportamentais foi considerada consistente com as descobertas em outros estudos em aves de natureza semelhante, sendo em média 35 a 40 dB mais altos em RATC que em estudos comportamentais. Existem várias possíveis explicações para esta diferença de sensibilidade absoluta em audiogramas comportamentais em oposição aos realizados com base em RATC. Uma delas é que RATC não contabiliza a integração temporal por ser uma resposta provocada por um estímulo intermitente (Crowell et al., 2015; Borg 1982; Borg and Engström 1983; Gorga et al. 1988; Brittan-Powell et al. 2002, 2005; Wolski et al. 2003; Yuen et al. 2005; Houser and Finneran 2006; Henry and Lucas 2008; Woolley and Rubel 1999).

Também o facto de termos utilizado isoflorano pode ter tido influência nos resultados, visto que já foi descrito que este poderá aumentar os limiares auditivos em relação à anestesia mais convencionalmente utilizada com uma combinação de quetamina e xilazina para realizar este teste, com uma redução da sensibilidade auditiva durante a duração da anestesia (Crowell et al., 2015).

Assim, este teste não é uma forma viável de determinar a sensibilidade absoluta, mas possibilita uma estimativa viável do formato do audiograma e consequentemente do intervalo e frequência de melhor audição.

O espectro auditivo de cada ave não pode ser definido de acordo com estes testes porque não se testaram frequências nas quais não houvesse resposta (exceto *Gyps fulvus* aos 125 Hz), portanto não é possível estabelecer limites válidos.

Conclusão

A detecção de RATC em aves trata-se de um tipo de eletroencefalograma especializado que permite inferir acerca da sensibilidade auditiva do sujeito em questão.

Recorre-se a um audiómetro que produz um sinal sonoro pré-definido e o administra, através de um transdutor, no meato auditivo externo do indivíduo em teste. O sinal bioelétrico desencadeado pelo estímulo é posteriormente recolhido pelos elétrodos e armazenado e processado num computador, com software especializado. Este processamento pós-recolha do sinal é bastante determinante para o resultado final, especialmente a média de sinais, que tem o efeito de limpar o ruído elétrico, de entre a informação recolhida, ficando salientada a resposta de interesse, RATC. A ferramenta de análise auditiva mais importante que vai surgir deste teste é o audiograma, que permite extrapolar não só a zona como a frequência de melhor audição e possivelmente o espectro auditivo. Estes são os parâmetros que nos vão dar uma estimativa em relação à sensibilidade auditiva de cada ave.

A aplicação prática com as adaptações realizadas (essencialmente o esquema de elétrodos e o tipo de transdutor) foi realizada com sucesso, possivelmente até maior do que o descrito nos estudos realizados anteriormente em aves pois foram identificados mais componentes de resposta. Portanto, foi realizada com sucesso a detecção de RATC nestas aves, indicando que também nestas espécies de rapinas a estimativa de sensibilidade auditiva pode ser feita através deste método, tal como já foi observado noutras espécies de aves canoras, rapinas noturnas e em alguns anseriformes. Todas apresentaram um audiograma com forma em U e com zonas de maior sensibilidade entre os 1000 e os 8000 Hz, apresentando um ligeiro desvio para as altas frequências, comparado com a zona de maior sensibilidade média em aves (1000-4000Hz). Este desvio foi provocado em grande parte por *Falco tinnunculus* que apresentou maior sensibilidade para frequências mais elevadas que as outras duas aves e que a maioria das aves testadas em outros estudos até à data, com exceção de rapinas noturnas que têm uma sensibilidade excecional para altas frequências. *Aquila chrysaetos* também teve parte neste desvio pois apesar de a sua real frequência de maior sensibilidade ser os 2000 Hz, esta apresentou um limiar de sensibilidade absoluta igual aos 4000 Hz (40 dB). *Gyps fulvus* por sua vez apresentou limiares absolutos relativamente elevados e uma zona de maior sensibilidade entre os 1000 e os 4000 Hz, sendo compatível com o padrão determinado em aves.

16. Perspetivas futuras

Este teste tem já bastantes aplicações em medicina humana como identificação de patologia auditiva ou nervosa ao nível do tronco cerebral, monitorização intra-cirúrgica da integridade dos caminhos nervosos que poderão ser (em alguns casos estão já a ser) extrapoladas e para medicina veterinária.

Além disso, o aprofundar de conhecimentos de audição em aves através deste teste tem muito interesse na área de investigação. A determinação de padrões auditivos para varias espécies de aves pode ser aplicada por exemplo em estudos relacionados a regeneração de células ciliadas em aves (que também poderá ter aplicações ao nível da audiologia humana). Também para medicina de conservação para garantir a integridade auditiva e nervosa de aves antes da sua libertação. Uma aplicação importante em aves é também a criação de repelentes auditivos em infraestruturas humanas que sejam causa frequente de mortalidade em espécies silvestres. Existe também interesse no sentido de continuar o desenvolvimento de uma melhor técnica para melhorar a sensibilidade do teste em aves.

Seria também interessante aprofundar o efeito que o registo com esquema de elétrodos de dois canais e a utilização de auriculares em que vez de coluna pode ter em RATC de aves, testando se é realmente significativo. Se for o caso será possível progredir para obter RATC com mais informação e melhor qualidade em aves.

17. Limitações do estudo

Os poucos casos disponíveis para este estudo foram a sua maior limitação. Um objetivo mais interessante para um estudo nesta área teria sido a determinação do padrão de audição de uma espécie de ave adulta, para o qual eram necessários mais exemplares de cada espécie. Poder-se-ia então ter feito uma análise estatística de forma a descrever padrões auditivos destas espécies ainda não testadas nesta área. Estes padrões poderiam depois ser utilizados como ferramenta para variados estudos relacionados com a audição em aves, alguns mencionados no capítulo 5 “Aplicações da técnica em aves”.

Existiram também algumas limitações técnicas relacionadas com a deteção de resposta propriamente dita. Algumas interferências elétricas que potencialmente alteraram os resultados poderiam ser evitadas com um maior controlo do ambiente em que é realizado o teste, eliminando todos os aparelhos eletrónicos não necessários à sua realização. Além disso, também para melhorar a qualidade do registo, poder-se-ia fazer uma melhor otimização do protocolo de processamento do sinal de forma a obter o máximo de amplificação do sinal e o mínimo de ruído de fundo possível, essencialmente com uma filtração e rejeição de artefactos adequada e uma média de sinais correta.

Referências

- Aleksandrov, L. I., & Dmitrieva, L. P. (1992). Development of auditory sensitivity of altricial birds: absolute thresholds of the generation of evoked potentials. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 22(2), 132–137.
- Bartheld, C. S. von. (1994). Functional morphology of the paratympanic organ in the middle ear of birds. *Brain, Behavior and Evolution*, 44(2), 61–73.
- Beatini, J. R., Proudfoot, G. A., & Gall, M. D. (2018). Frequency sensitivity in Northern saw-whet owls (*Aegolius acadicus*). *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 204(2), 145–154.
- Beck, M. M., Brown-Borg, H. M., & Jones, T. A. (1987). Peripheral and brainstem auditory function in paroxysmal (px) White Leghorn chicks. *Brain Research*, 406(1–2), 93–98.
- Bess, F. H., & Humes, L. E. (2008). *Audiology The Fundamentals* (4th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Bidelman, G. M. (2015). Multichannel recordings of the human brainstem frequency-following response: Scalp topography, source generators, and distinctions from the transient ABR. *Hearing Research*, 323, 68–80.
- Blum, A. S., & Rutkove, S. B. (2007). *The Clinical Neurophysiology Primer* (1st ed.). New Jersey: Humana Press.
- Boston, J. R., & Møller, A. R. (1985). Brainstem auditory-evoked potentials. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 13(2), 97–123.
- Brewer, A. C., Endly, D. C., Henley, J., Amir, M., Sampson, B. P., Moreau, J. F., ... Rey-Martinez, J. (2003). Audiometry Procedures Manual. *National Health and Nutrition Examination Survey*.
- Brittan-Powell, E. F., & Dooling, R. J. (2004). Development of auditory sensitivity in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *The Journal of the Acoustical Society of America*, 115(6), 3092–3102.
- Brittan-Powell, E. F., Dooling, R. J., & Gleich, O. (2002). Auditory brainstem responses in adult budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *The Journal of the Acoustical Society of America*, 112(3), 999–1008.
- Brittan-Powell, E. F., Dooling, R. J., Ryals, B., & Gleich, O. (2010a). Electrophysiological and morphological development of the inner ear in Belgian Waterslager canaries. *Hearing Research*, 269(1–2), 56–69.
- Brittan-Powell, E. F., Dooling, R. J., Ryals, B., & Gleich, O. (2010b). Electrophysiological and morphological development of the inner ear in Belgian Waterslager canaries. *Hearing Research*, 269(1–2), 56–69.
- Brittan-Powell, E. F., Dooling, R. J., Ryals, B., & Gleich, O. (2010c). Electrophysiological and morphological development of the inner ear in Belgian Waterslager canaries. *Hearing Research*, 269(1–2), 56–69.
- Brittan-Powell, E. F., Lohr, B., Hahn, D. C., & Dooling, R. J. (2005). Auditory brainstem responses in the Eastern Screech Owl: An estimate of auditory thresholds. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 118(1), 314–321.

- Brown-Borg, H. M., Beck, M. M., & Jones, T. A. (1986). Origins of peripheral and brainstem auditory responses in the white leghorn chick. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 88(3), 391–396.
- Burkard K., Don M. (2015). Introduction to Auditory Evoked Potentials. In J. Katz (Ed.), *Handbook of Clinical Audiology*. (7th Ed.). (pp.187-205). Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
- Caras, M. L., Brenowitz, E., & Rubel, E. W. (2010). Peripheral auditory processing changes seasonally in Gambel's white-crowned sparrow. *Journal of Comparative Physiology A*, 196, 581–599.
- Carr, C. E., & Boudreau, R. E. (1993). Organization of the nucleus magnocellularis and the nucleus laminaris in the barn owl: Encoding and measuring interaural time differences. *Journal of Comparative Neurology*, 334(3), 337–355.
- Coles, B. H. (2007). *Essentials of Avian Medicine & Surgery* (3rd ed.). Oxford: Blackwell Publishing.
- Colon, E., Visser, S., Weerd, J. de, & Zonneveldt, A. (1983). *Evoked Potential Manual* (1st ed.). Dordrecht: Springer-Science+Business Media, B.V.
- Cooper, J. E. (2002). Birds of Prey. In *Birds of Prey: Health & Disease* (3rd editio). Malden: Blackwell Science.
- Crowell, S. E., Wells-Berlin, A. M., Carr, C. E., Olsen, G. H., Therrien, R. E., Yannuzzi, S. E., & Ketten, D. R. (2015). A comparison of auditory brainstem responses across diving bird species. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 201(8), 803–815.
- Dmitrieva, L. P., & Gottlieb, G. (1994). Influence of Auditory Experience on the Development of Brain Stem Auditory-Evoked Potentials in Mallard Duck Embryos and Hatchlings. *Behavioral and Neural Biology*, 61, 19–28.
- Dobie, R., & Van Hemel, S. (2005). *Hearing Loss: Determining Eligibility for Social Security Benefits* (1st ed.). Washington, D.C.: The National Academies Press.
- Dooling, R. (2002). *Avian Hearing and the Avoidance of Wind Turbines*. Golden, Colorado.
- Dooling, R. J. (1980). Behavior and psychophysics of hearing in birds. In *Comparative Studies of Hearing in Vertebrates* (pp. 261–288). New York: Springer-Verlag.
- Dooling, R. J., Fay, R. R., & Popper, A. N. (2000). Comparative Hearing: Birds and Reptiles. In *Springer Handbook of Auditory Research* (1st ed., Vol. 13). New York: Springer Science+Business Media.
- Dooling, R. J., Lohr, B., & Dent, M. L. (2000). Hearing in Birds and Reptiles. In *Comparative Hearing: Birds and Reptiles* (pp. 308–334). New York: Springer-Verlag.
- Gall, M. D., Brierley, L. E., & Lucas, J. R. (2011). Species and sex effects on auditory processing in brown-headed cowbirds and red-winged blackbirds. *Animal Behaviour*, 81(5), 973–982.
- Gill, F. B. (2007). *Ornithology* (3rd ed.). New York: W.H. Freeman and Company.
- Gleich, O. (1988). Auditory primary afferents in the starling: Correlation of function and morphology. *Hearing Research*, 37(3), 255–267.

- Goldstein, R., & M.Aldrich, W. (1999). *Evoked Potential Audiometry* (1st ed.). Needham: Allyn and Bacon.
- Gummer, A. W., Smolders, J. W. T., & Klinke, R. (1989). Mechanics of a single-ossicle ear: I. The extra-stapedius of the pigeon. *Hearing Research*, 39(1–2), 1–13.
- Hall, J. W. (2015). *eHandbook of Auditory Evoked Responses: Principles, Procedures and Protocols*. Boston: Amazon Digital Services LLC.
- Harrison, G. J., & Lightfoot, T. L. (2006). *Clinical Avian Medicine* (1 st). Palm Beach, Florida: Spix Publishing.
- Henry, K. S., & Lucas, J. R. (2009). Vocally correlated seasonal auditory variation in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Journal of Experimental Biology*, 212(23), 3817–3822.
- Henry, Kenneth S., & Lucas, J. R. (2008). Coevolution of auditory sensitivity and temporal resolution with acoustic signal space in three songbirds. *Animal Behaviour*, 76(5), 1659–1671.
- Henry, Kenneth S, & Lucas, J. R. (2010). Auditory sensitivity and the frequency selectivity of auditory filters in the Carolina chickadee, *Parus carolinensis*. *Animal Behaviour*, 80(3), 497–507.
- Hill, E. M. (2011). *A comparison of behavioral and auditory brainstem response measures of hearing in the laboratory rat (Rattus norvegicus)*. University of Toledo.
- Janssen, R. (2008). *Diagnostic Auditory Brainstem Response - Training Manual*.
- Jones, T. A., Beck, M. M., Brown-Borg, H. M., & Burger, R. E. (1987). Far-field recordings of short latency auditory responses in the White Leghorn chick. *Hearing Research*, 27(1), 67–74.
- Jørgensen, J. M. (1984). Fine Structure of The Paratympanic Organ in the Avian Middle Ear. *Acta Zoologica*, 65(2), 89–94.
- Katayama, A. (1985). Postnatal development of auditory function in the chicken revealed by auditory brain-stem responses (ABRs). *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 62, 388–398.
- Katz, J. (2015). *Handbook of Clinical Audiology* (7th ed.; J. Katz, Ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer.
- Knight, J. (1968). *Hearing Mechanisms in Vertebrates*. London: J. & A. Churchill.
- Kraemer, A., Baxter, C., Hendrix, A., & Carr, C. E. (2017). Development of auditory sensitivity in the barn owl. *Journal of Comparative Physiology A*, 203(10), 843–853.
- Kroodsma, D. E., & Miller, E. H. (1982). Acoustic Communication in Birds. In *Communication and behavior* (Vol. 1). London: Academic Press.
- Kuokkanen, P. T., Kraemer, A., Kempter, R., & Carr, C. E. (2018). *Auditory Brainstem Response Wave III is Correlated with Extracellular Field Potentials from Nucleus Laminaris of the Barn Owl*. 104(5), 874–877.
- Laumen, G., Ferber, A. T., Klump, G. M., & Tollin, D. J. (2016). The Physiological Basis and Clinical Use of the Binaural Interaction Component of the Auditory Brainstem Response. *Ear and Hearing*, 37(5), 276–290.

- Lohr, B., Brittan-Powell, E. F., & Dooling, R. J. (2013). Auditory brainstem responses and auditory thresholds in woodpeckers. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 133(1), 337–342.
- Lovette, I. J., & Fitzpatrick, J. W. (2016). *Handbook of Bird Biology* (3rd ed.). West Sussex: Cornell University.
- Lucas, J. R., Freeberg, T. M., Krishnan, A., & Long, G. R. (2002). A comparative study of avian auditory brainstem responses: Correlations with phylogeny and vocal complexity, and seasonal effects. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 188(11–12), 981–992.
- Lucas, Jeffrey R, Henry, K. S., Gall, M. D., & Vélez, A. (2016). Avian Auditory Processing at Four Different Scales: Variation Among Species, Seasons, Sexes, and Individuals. In M. A. Bee & C. T. Miller (Eds.), *Psychological Mechanisms in Animal Communication* (1st ed., Vol. 5, pp. 17–55). Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG.
- Martin, G. R. (2017). The Sensory Ecology of Birds. In T. R. Birkhead (Ed.), *Oxford Avian Biology Series* (1st ed., Vol. 3). Oxford: Oxford University Press.
- Moiseff, A., & Konishi, M. (1981). Neuronal and behavioral sensitivity to binaural time differences in the owl. *The Journal of Neuroscience*, 1(1), 40–48.
- Møller, A. R., & Jannetta, P. J. (1985). Neural Generators of the Auditory Brainstem Response. In *The Auditory Brainstem Response* (1st ed., pp. 15–34). San Diego, California: College-Hill Press.
- Moore, J. K. (1987). The human auditory brain stem as a generator of auditory evoked potentials. *Hearing Research*, 29(1), 33–43.
- Necker, R. (2000). The Avian Ear and Hearing. In *Avian Physiology* (5th ed., pp. 21–38). Academic Press.
- Noirot, I. C., Brittan-Powell, E. F., & Dooling, R. J. (2011a). Masked auditory thresholds in three species of birds, as measured by the auditory brainstem response (L). *The Journal of the Acoustical Society of America*, 129(6), 3445–3448.
- Noirot, I. C., Brittan-Powell, E. F., & Dooling, R. J. (2011b). Masked auditory thresholds in three species of birds, as measured by the auditory brainstem response (L). *Acoustical Society of America*, 129(6), 3445–3448.
- Okanoya, K., & Dooling, R. J. (1987). Hearing in passerine and psittacine birds: a comparative study of absolute and masked auditory thresholds. *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C. : 1983)*, 101(1), 7–15.
- Popper, A. N., & Fay, R. R. (1980). *Comparative studies of hearing in vertebrates* (1st ed.). New York: Springer-Verlag.
- Ramsier, M. A., & Dominy, N. J. (2010). A comparison of auditory brainstem responses and behavioral estimates of hearing sensitivity in Lemur catta and Nycticebus coucang. *American Journal of Primatology*, 72(3), 217–233.
- Saunders, J C. (1985). Auditory structure and function in the bird middle ear: An evaluation by scanning electron microscope and capacitive probe. *Hearing Research*, 18, 253–268.
- Saunders, James C., Duncan, R. K., Doan, D. E., & Werner, Y. L. (2000). The Middle Ear of

- Birds and Reptiles. In *Comparative Hearing: Birds and Reptiles* (Vol. 13, pp. 13–69). New York: Springer-Verlag.
- Scanes, C. G. (2015). *Sturkie's Avian Physiology* (6th ed.; C. G. Scanes, Ed.). Oxford: Elsevier.
- Scheifele, P. M., & Clark, J. G. (2012). Electrodiagnostic Evaluation of Auditory Function in the Dog. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 42(6), 1241–1257.
- Stapells, D. R. (2000). Frequency-Specific Evoked Potential Audiometry in Infants. *A Sound Foundation Through Early Amplification*, 13–31.
- Stevens, J., Booth, R., Brennan, S., Feirn, R., & Meredith, R. (2013). Guidance for Auditory Brainstem Response testing in babies. Version 2.1. *Newborn Hearing Screening and Assessment*.
- Struppler, A., & Weindl, A. (1985). *Electromyography and evoked potentials: Theories and Applications* (1^a). Berlin: Springer-Verlag.
- Sturkie, Paul David. (1986). *Avian physiology* (4th ed.; Paul D. Sturkie, Ed.). New York: Springer-Verlag.
- Takasaka, T., & Smith, C. A. (1971). The structure and innervation of the pigeon's basilar papilla. *Journal of Ultrastructure Research*, 35(1–2), 20–65.
- Tandon, O. P. (1998). Average evoked potentials - Clinical applications of short latency responses. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, 42(2), 172–188.
- Vidler, M., & Parker, D. (2004). Auditory brainstem response threshold estimation: Subjective threshold estimation by experienced clinicians in a computer simulation of the clinical test. *International Journal of Audiology*, 43(7), 417–429.
- Whittow, G. C. (2000). *Sturkie's Avian Physiology* (5th ed.). Academic Press.
- Wolf, S. E., Swaddle, J. P., Cristol, D. A., & Buchser, W. J. (2017). Methylmercury Exposure Reduces the Auditory Brainstem Response of Zebra Finches (*Taeniopygia guttata*). *JARO - Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 18(4), 569–579.
- Woolley, S. M. N., Wissman, A. M., & Rubel, E. W. (2001). *Hair cell regeneration and recovery of auditory thresholds following aminoglycoside ototoxicity in Bengalese finches*. 153, 181–195.

Anexos

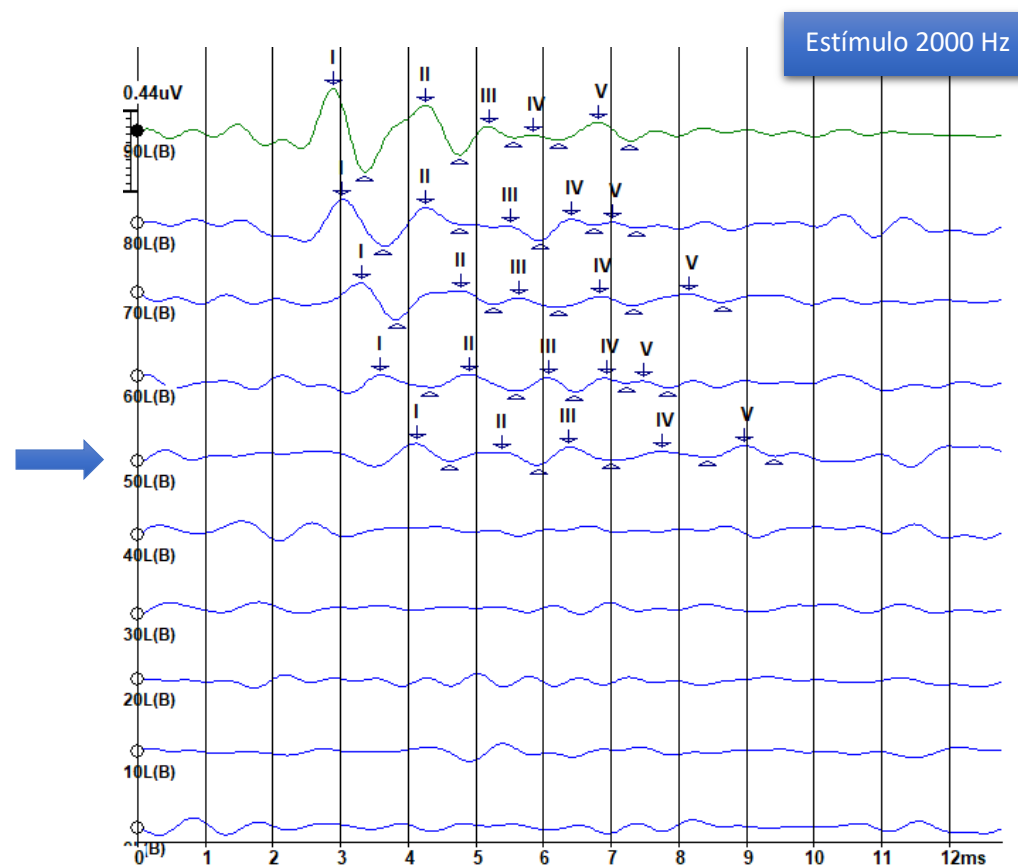
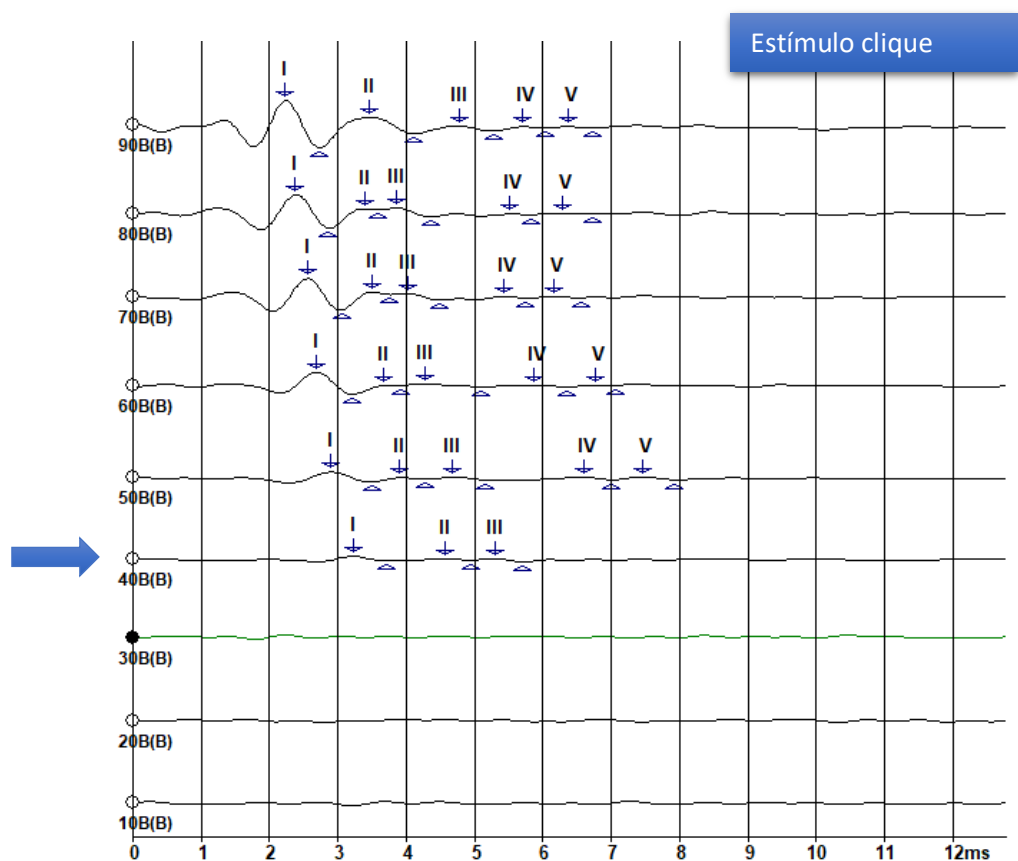
Anexo 1– Dados recolhidos para cada animal.

Data	17/10/17	10/01/17	28/02/17
Espécie	<i>Gyps fulvus</i>	<i>Falco tinnunculus</i>	<i>Aquila chrysaetos</i>
IHS	4032-2017AH01	4032-2017A01	4032-20172S02
Nº Historial	12/0051	12/3247	10/0171
Nº Anilha	H0403	K0048	H0725
Peso (g)	8300	216	3860
CC	4	3	3,5
Sexo	Indefinido	Fêmea	Macho
Medida cranial			
Antero-posterior (mm)	89	38,86	72,84
Medida cranial			
Latero-lateral (mm)	63	32,68	65,96
Ouvido Registrado	Esquerdo	Esquerdo	Esquerdo

Anexo 2– Valores de limiares de intensidade a cada frequência testada para cada animal.

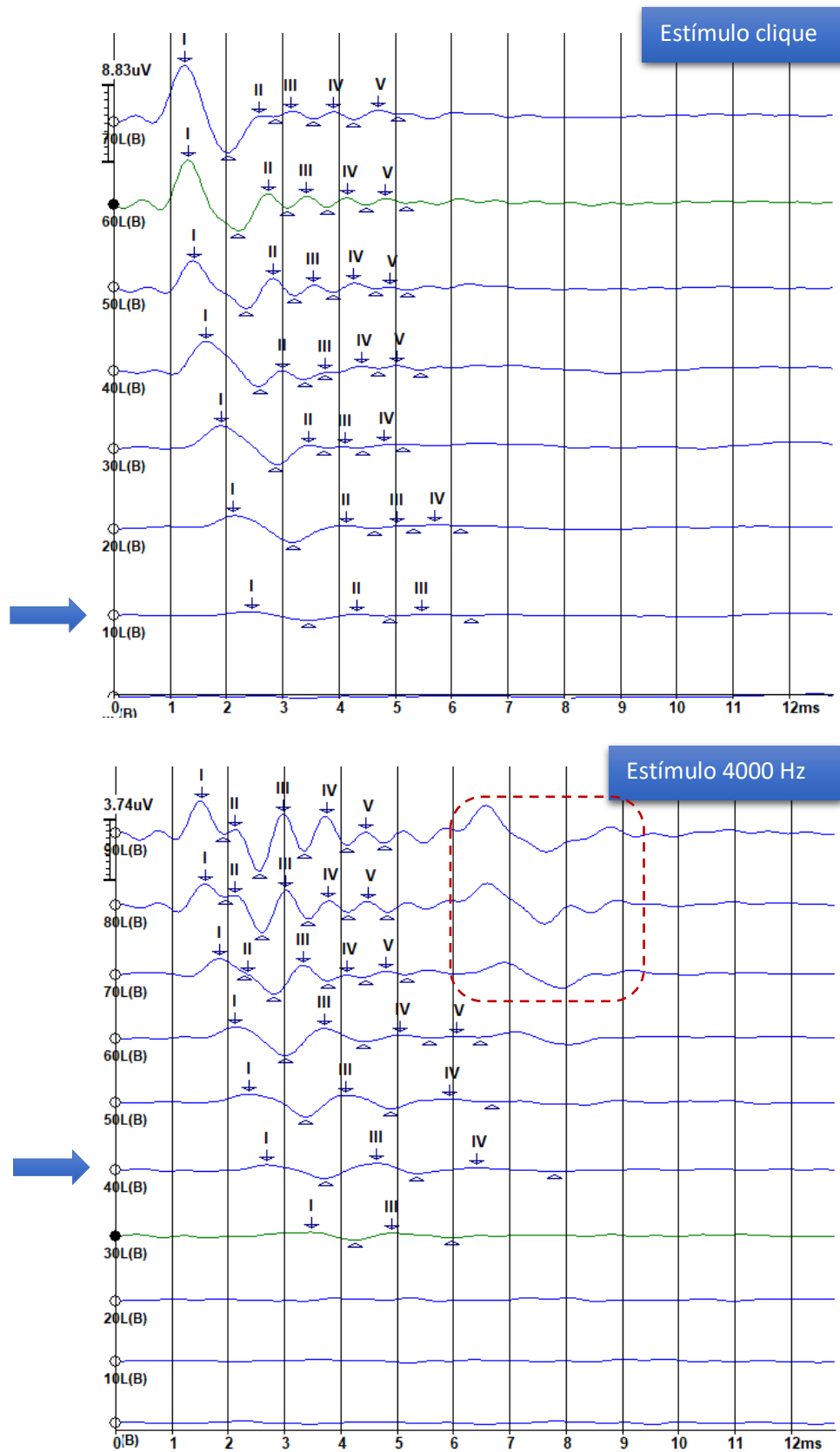
ESPECIE/FREQUÊNCIA (Hz)	125	250	500	1000	2000	4000	8000	CLIQUE
<i>Gyps fulvus</i>	-	80	70	60	50	60	80	50
<i>Falco tinnunculus</i>	80	70	70	50	50	30	60	10
<i>Aquila chrysaetos</i>	90	90	80	50	40	40	60	20

Anexo 3— Traçados resposta de *Gyps fulvus* (Original).



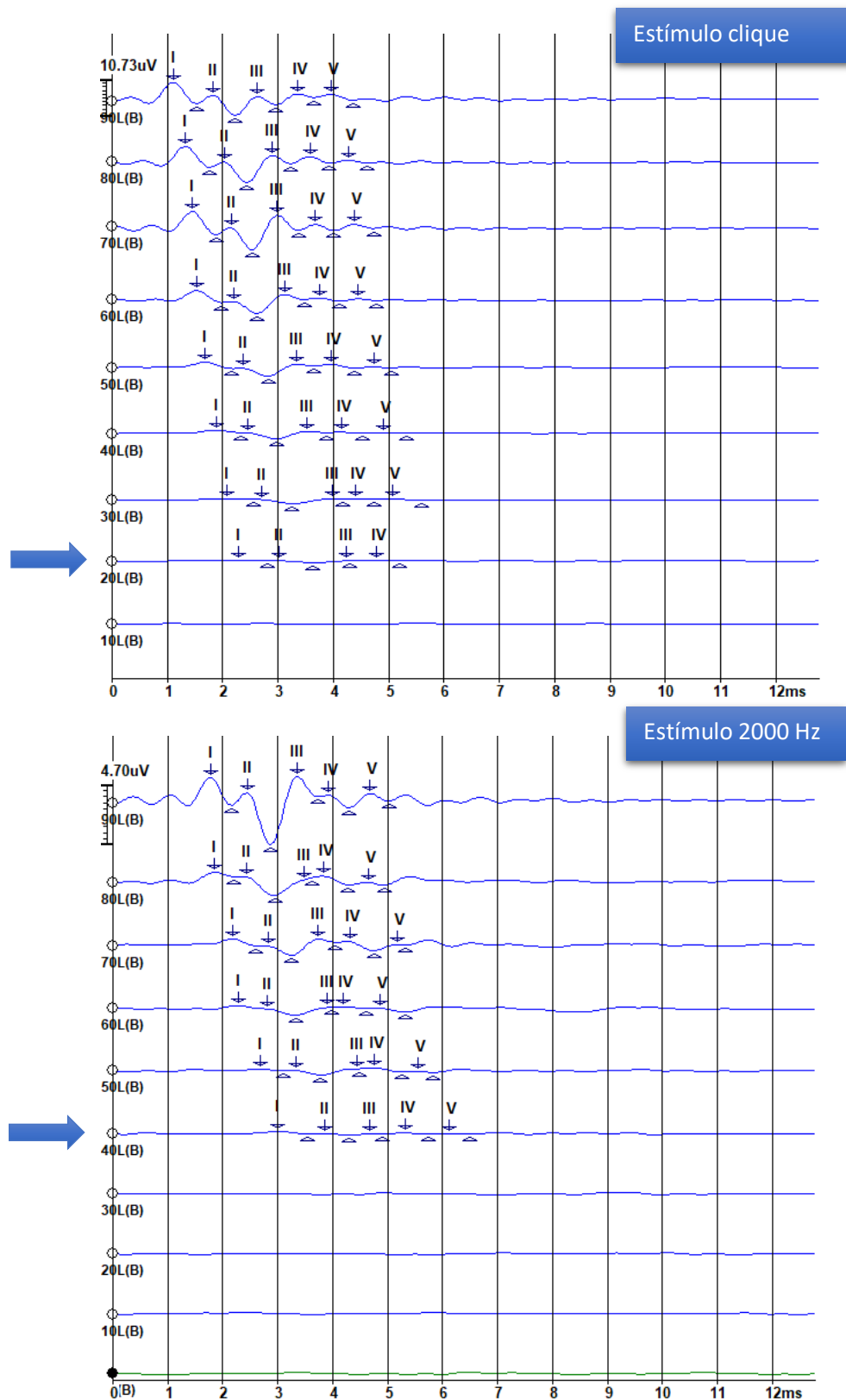
Resposta num intervalo de latência entre os 0 e os 12 ms a estímulo de clique (a) e de 2000 Hz (frequência de melhor audição desta ave) (b) com intensidades a variar entre os 10 a 90 dB SPL (em intervalos de 10 em 10). No traçado do clique foi identificada resposta entre os 40 dB SPL (limiar) e os 90 dB SPL e no de 2000 Hz foi identificada resposta entre os 50 dB SPL (limiar) e 90 dB SPL.

Anexo 4— Traçados resposta de *Falco tinnunculus* (Original).

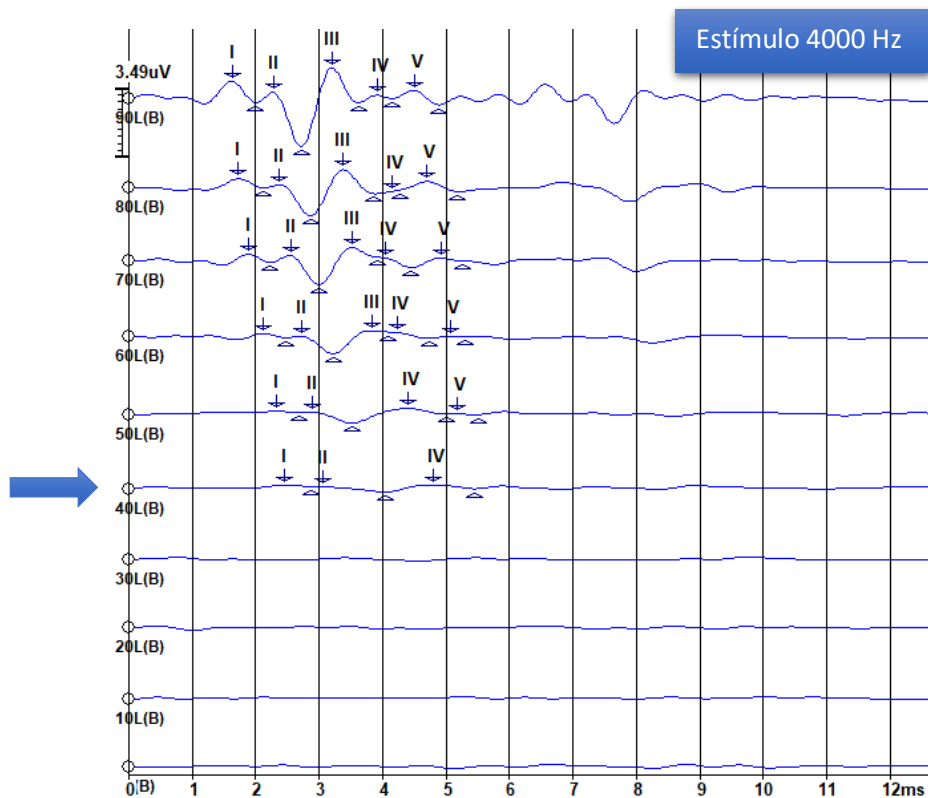


Resposta num intervalo de latência entre os 0 e os 12 ms a estímulo de clique (a) e de 4000 Hz (frequência de melhor audição deste animal) (b). No clique foram testadas intensidades entre os 10 a 70 dB SPL (em intervalos de 10 em 10) e no estímulo de 4000 Hz entre os 10 e os 90 dB SPL. No traçado do clique foi identificada resposta dos 10 dB SPL (limiar) aos 70 dB SPL e no de 4000 Hz foi identificada resposta dos 30 dB SPL (limiar) aos 90 dB SPL. No quadrado vermelho estão três ondas repetíveis, não identificadas como resposta do tronco cerebral.

Anexo 5 – Traçados resposta do exemplar de *Aquila chrysaetos* (Original).



Anexo 5 (continuação)



Resposta num intervalo de latência entre os 0 e os 12 ms a estímulo de clique (a), 2000 (b) e de 4000 Hz (frequências de melhor audição deste animal) (c). As intensidades usadas para o teste de cada frequência variam entre os 10 a 90 dB SPL (em intervalos de 10 em 10). No traçado do clique foi identificada resposta entre os 20 dB SPL (limiar) e os 90 dB SPL, no de 2000 Hz foi identificada resposta entre os 40 dB SPL (limiar) e 90 dB SPL e no de 4000 Hz o limiar definido foi de 40 dB SPL com resposta desde os 90 dB SPL.

Anexo 6 – Comparação de gráficos de RATC obtidos neste trabalho com os obtidos em outros estudos.

